

# Fluoreszenzsonden zur Quantifizierung des chelatisierbaren Eisenpools in Kompartimenten vitaler Zellen

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften im Fachbereich Chemie  
der Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von  
Andrea Springer  
aus Wesel

Essen 2006

Referent: Prof. Dr. Dr. h.c. R. Sustmann

Korreferent: Prof. Dr. Dr. H. de Groot

Tag der mündlichen Prüfung: 14.07.06

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 2002 bis Juni 2006 im Institut für Organische Chemie der Universität Duisburg-Essen sowie im Institut für Physiologische Chemie des Universitätsklinikums Essen angefertigt. Mein besonderer Dank gilt

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Reiner Sustmann

für die Überlassung des interessanten Themas, die mir stets gewährte Unterstützung und die wertvollen Ratschläge während der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Dr. Herbert de Groot

danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferates, für die anregenden Diskussionsbeiträge und das Einverständnis zur Durchführung zahlreicher Experimente am Institut für Physiologische Chemie.

Bedanken möchte ich mich bei allen Mitgliedern des Institutes für Organische Chemie für die Unterstützung und das ausgezeichnete Arbeitsklima, insbesondere danke ich Herrn Thorsten Thiel und Frau Helma Kallweit für ihre Unterstützung und Hilfsbereitschaft, sowie Herrn Dr. Hans-Gert Korth für die stets gewährte Hilfe.

Dank aussprechen möchte ich auch allen Mitgliedern des Institutes für Physiologische Chemie für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die hervorragende Kooperation. Sehr herzlich danken möchte ich vor allem Frau Priv.-Doz. Dr. Ursula Rauen für die intensive Betreuung der Arbeiten am Institut für Physiologische Chemie und Frau Birgit Lammers sowie Frau Natalie Boschenkov für die Bereitstellung der benötigten Zellen und stets gewährte Unterstützung.

Danken möchte ich zudem den Herren Heinz Bandmann und Thorsten Schaller für die Anfertigung der NMR- Spektren.

Desweiteren danke ich der WASAG-Stiftung für Studienförderung für die finanzielle Unterstützung.

Ganz besonders danke ich meinem Mann der mich mit viel Geduld, Rücksichtnahme und Hilfsbereitschaft immer unterstützt hat.



---

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>- 1 -</b>
1.1	Eisenstoffwechsel.....	- 2 -
1.2	Rezeptorvermittelte Endocytose von Transferrin .....	- 3 -
1.3	Der chelatisierbare Eisenpool .....	- 5 -
1.4	ROS (reactive oxygen species).....	- 7 -
1.4.1	Bildung des Superoxidradikalanions .....	- 7 -
1.4.2	Das Hydroxyl-Radikal.....	- 11 -
1.4.3	Schädigung durch ROS .....	- 13 -
1.4.3.1	Lipidperoxidation .....	- 14 -
1.4.3.2	Oxidative Schädigung von DNA.....	- 17 -
1.5	Der chelatisierbare Eisenpool in Mitochondrien .....	- 20 -
1.6	Lysosomen und Endosomen.....	- 22 -
1.7	Der chelatisierbare Eisenpool in den Lysosomen/ Endosomen .....	- 24 -
1.8	Fluoreszenzspektroskopie.....	- 26 -
1.9	Quantifizierung des chelatisierbaren Eisens .....	- 29 -
<b>2</b>	<b>Problemstellung .....</b>	<b>- 33 -</b>
<b>3</b>	<b>Darstellung der Fluoreszenzindikatoren .....</b>	<b>- 37 -</b>
3.1	Darstellung einer mitochondrialen Fluoreszenzsonde.....	- 37 -
3.1.1	Darstellung von Rhodamin B-4-[bis(pyridin-2-yl- methyl)aminocarbonyl] benzylester ( <b>6</b> ) .....	- 37 -
3.1.2	Darstellung von Rhodamin B-[bis(pyridin-2-yl- methyl)aminobenzylester ( <b>12</b> ).....	- 38 -
3.1.3	Kontrollsubstanz für mitochondriale Fe-Bestimmung .....	- 39 -
3.2	Darstellung einer lysosomalen Fluoreszenzsonde .....	- 42 -
3.2.1	Darstellung von Phenac .....	- 43 -
3.2.2	Darstellung BODIPYs.....	- 47 -
<b>4</b>	<b>Messungen im chemischen System .....</b>	<b>- 62 -</b>
4.1	Mitochondriale Fluoreszenzsonde.....	- 62 -
4.2	Lysosmale Fluoreszenzsonden .....	- 69 -
4.2.1	Phenac .....	- 69 -
4.2.2	BDA.....	- 74 -

---

<b>5</b>	<b>Messungen im zellulären System .....</b>	<b>- 80 -</b>
5.1	Mitochondriale Fluoreszenzsonde PIRO .....	- 80 -
5.1.1	Lokalisation in den Mitochondrien .....	- 80 -
5.1.2	Konzentrationsbestimmung in den Mitochondrien.....	- 81 -
5.1.3	Löschung der Fluoreszenz in den Mitochondrien.....	- 82 -
5.1.4	Entquenchung der Fluoreszenzintensität .....	- 83 -
5.2	Lysosomale Fluoreszenzsonden .....	- 86 -
5.2.1	Phenac (4{[3,6-Bis(dimethylamino)acridin-9-yl]thio}methyl)-N-(1,10-phenanthroline-5-yl)benzamid) ( <b>8</b> ).....	- 86 -
5.2.1.1	Lokalisation in den Lysosomen .....	- 86 -
5.2.2	BDA 2,6-bis-[N-(2-dimethyl-ethyl)-propionamid]-8-(2,2'-bipyridyl)-4,4'-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bor-3a,4a-diaza-s-indacen ( <b>61</b> ).....	- 89 -
5.2.2.1	Lokalisation in den Lysosomen .....	- 89 -
5.2.2.2	Konzentrationsbestimmung in den Lysosomen.....	- 90 -
5.2.2.3	Löschung / Entquenchung der Fluoreszenz in den Lysosomen.....	- 90 -
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>- 93 -</b>
<b>7</b>	<b>Ausblick .....</b>	<b>- 98 -</b>
<b>8</b>	<b>Experimenteller Teil .....</b>	<b>- 100 -</b>
8.1	Instrumentelle Analytik .....	- 100 -
8.2	Trocknung der Lösungsmittel.....	- 103 -
8.3	verwendete Chemikalien zur Synthese .....	- 103 -
8.4	Chemikalien für zelluläre Messungen.....	- 104 -
8.5	Untersuchungen im chemischen System .....	- 105 -
8.5.1	verwendete Medien und Lösungen .....	- 105 -
8.5.2	Untersuchung der Fluoreszenzsonden im chemischen System.....	- 106 -
8.5.3	Untersuchungen verschiedener Einflußfaktoren auf das Fluoreszenz-verhalten.....	- 107 -
8.6	Untersuchungen im zellulären System .....	- 108 -
8.6.1	Verwendete Medien und Lösungen.....	- 108 -

---

8.6.2	organellspezifische Verteilung der Fluoreszenzindikatoren .....	109 -
8.6.3	Löschung der intrazellulären Fluoreszenz.....	110 -
8.6.4	Quantifizierung des chelatisierbaren Eisens in Mitochondrien .....	111 -
8.6.5	Quantifizierung des chelatisierbaren Eisens in Lysosomen / Endosomen .....	112 -
8.7	Zellen .....	113 -
8.7.1	Versuchstiere .....	113 -
8.7.2	Präparation und Kultivierung von Rattenhepatozythen .....	113 -
8.7.3	Kultivierung von Rattenleberendothelzellen .....	114 -
8.7.4	Kultivierung von Fibroblasten .....	114 -
8.8	Synthese der mitochondrialen Fluoreszenzsonde.....	115 -
8.8.1	Synthese von 4-(Brommethyl)-N,N-bis(pyridin-2-yl- methyl)benzamid ( <b>10</b> ) .....	115 -
8.8.2	Synthese von 4-(Brommethyl)-N,N-bis(pyridin-2-yl- methyl)benzamid ( <b>6</b> ) .....	117 -
8.8.3	Synthese von Rhodamin B-[bis(pyridin-2-yl- methyl)aminobenzylester ( <b>13</b> ) .....	121 -
8.9	Synthese grüne Kontrolle .....	125 -
8.9.1	Synthese 9-Nitrophenanthren ( <b>15</b> ) .....	125 -
8.9.2	Synthese von 9-Phenanthryl-amin ( <b>16</b> ) .....	126 -
8.9.3	(Brommethyl)-N-9-phenanthryl-benzamid ( <b>17</b> ) .....	127 -
8.9.4	Snthese von 4-(Hydroxymethyl)-N-9-phenanthryl-benzamid ( <b>18</b> ) .....	129 -
8.10	Synthese Phenac ( <b>8</b> ) .....	131 -
8.10.1	Synthese von 5-Nitro-1,10-phenanthrolin ( <b>23</b> ) .....	131 -
8.10.2	Synthese von 5-Amino-1,10-phenanthrolin ( <b>24</b> ) .....	132 -
8.10.3	Synthese von 4-Brommethyl-benzoesäurebromid ( <b>9</b> ) .....	133 -
8.10.4	Synthese von 4-(Brommethyl)-N-(1,10-phenanthrolin-5- yl)benzamid ( <b>28</b> ) .....	134 -
8.10.5	Darstellung von 3,6-Bis(dimethylamino)-9(10H)-acridinthion ( <b>27</b> ) .....	136 -
8.10.6	Synthese von 4{[3,6-bis(dimethylamino)acridin-9-yl]thio}methyl}- N-(1,10-phenanthrolin-5-yl)benzamid ( <b>8</b> ) .....	137 -

---

8.11	Synthese BODIPYs .....	141 -
8.11.1	Synthese BODIPY 1.....	141 -
8.11.1.1	Synthese von 8-(4-Benzoylbromid)-4,4'-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-2,6-dimethyl-4-bor-3a, 4a-diaza-s-indacen ( <b>31</b> ) .....	141 -
8.11.1.2	Synthese von 8-(6-Amino-1(benzoyl)-[1,10]-phenanthrolin-1-ium)-4,4'-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-2,6-dimethyl-4-bor-3a,4a-diaza-s-indacen ( <b>32</b> ) .....	146 -
8.11.2	Synthese BODIPY 2 ( <b>37</b> ) .....	150 -
8.11.2.1	Synthese von 4-Nitro-2,2'-bipyridin-1-oxid ( <b>35</b> ) .....	150 -
8.11.2.2	Synthese von 2,2'-Bipyridin-4-amin ( <b>36</b> ) .....	152 -
8.11.2.3	Synthese von 8-(4'-Amino-1-benzyl-[2,2']-bipyridinyl-1-ium)-4,4'-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-2,6-dimethyl-4-bor-3a,4a-diaza-s-indacen ( <b>37</b> ) .....	153 -
8.11.3	Synthese BODIPY 3.....	157 -
8.11.3.1	Synthese von 2-(Trimethylstannyl)pyridin ( <b>40</b> ).....	157 -
8.11.3.2	Synthese von 2,2'-Bipyridin-5-carbonsäuremethylester ( <b>42</b> ) .....	158 -
8.11.3.3	Synthese von 2,2'-Bipyridin-5-carbonsäure ( <b>43</b> ).....	159 -
8.11.3.4	Syntheseversuche von 2,2'-Bipyridin-5-carbonsäurehalogeniden.....	160 -
8.11.3.5	Synthese 2-Trifluormethansulfonsäure-4-methylpyridin ( <b>45</b> ).....	161 -
8.11.3.6	Synthese 4-Methyl-2,2'-bipyridin ( <b>46</b> ) .....	162 -
8.11.3.7	Synthese 2,2'-Bipyridin-4-carbaldehyd ( <b>47</b> ).....	163 -
8.11.3.8	Synthese von 3 ((E)-2-Cyano-1-methyl-vinylamino)-N-methoxy-N-methyl-acetamid ( <b>50</b> ).....	165 -
8.11.3.9	Synthese von Ethyl-((N-methoxycarbonyl)-methylamino)-crotonat ( <b>51</b> ).....	166 -
8.11.3.10	Synthese von 4-Ethyl-2-methylpyrrol-3-carbonitril ( <b>53</b> ) .....	167 -
8.11.3.11	Synthese von 2-(Dimethylaminomethyl)methylpyrrol ( <b>55</b> ).....	168 -
8.11.3.12	Synthese 3-(2-Methoxycarbonylethyl)-2,4-dimethylpyrrol ( <b>57</b> ) .....	169 -



8.11.3.13	Synthese von 2,6-bis-(propionsäuremethylester)-8-(2,2'-bipyridyl)-4,4'-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bor-3a,4a-diaza-s-indacen (BPE) ( <b>59</b> ).....	- 170 -
8.11.3.14	Synthese von 2,6-bis-[N-(2-dimethyl-ethyl)-propionamid]-8-(2,2'-bipyridyl)-4,4'-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bor-3a,4a-diaza-s-indacen (BDA) ( <b>61</b> ).....	- 175 -
8.11.4	Synthese von 4-Formyl-N-(1,10)-phenanthrolin-5-benzamid ( <b>65</b> ).....	- 179 -
<b>9</b>	<b>Literatur</b> .....	<b>- 182 -</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BDA	2,6-Bis-[N-(2-dimethyl-ethyl)-propionamid]-8-(2,2'-bipyridyl)-4,4'-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bor-3a,4a-diaza-s-indacen
BPE	2,6-Bis-(propionsäuremethylester)-8-(2,2'-bipyridyl)-4,4'-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bor-3a,4a-diaza-s-indacen
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DMAP	4-Dimethylaminopyridin
DNA	Desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DMT 1	divalenter Metall Transporter
EDTA	Ethylendiamintetraacetic acid (Ethylendiamintetraessigsäure)
ESI	Elektrospray Ionisation
ESR	Elektronenspinresonanz
FAD/FADH <sub>2</sub>	Flavinadenin-dinucleotid bzw. seine reduzierte Form
FRET	fluorescence resonance energy transfer
gs	gradient selected
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathiondisulfid
HBSS	Hanks' balanced salt solution (Hanks' gepufferte Salzlösung)
HMM	high molekular mass (hochmolekulare Masse)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (hochaufgelöste Flüssigchromatographie)
IRP	Iron Regulatory Proteins (eisenbindende Proteine)
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MS	Massenspektrometrie
mtDNA	mitochondriale DNA
NAD(P)H + H <sup>+</sup>	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat (reduzierte Form)
NMR	nuclear magnetic resonance (Kernresonanz)

- Abkürzungsverzeichnis -

---

Pd/C	Palladium auf Aktivkohle
PIH	Pyridoxalisonicotinoylhydrazon
ppm	parts per million (Anteil pro 100000)
RDA	Rhodamin B-4-[(2,2'-bipyridin-4-yl)aminocarbonyl]benzylester
RPA	Rhodamin B-4-[(1,10-phenanthrolin-5-yl)aminocarbonyl]benzylester
PHENAC	4{[3,6-Bis(dimethylamino)acridin-9-yl]thio}methyl}-N-(1,10-phenanthrolin-5-yl)benzamid
PIRO	Rhodamin B-[bis(pyridin-2-yl-methyl)aminobenzyl-ester
ROS	reactive oxygen species (reaktive Sauerstoffspezies)
SDS	Sodiumdodecylsulfate (Natriumdodecylsulfat)
SOD	Superoxiddismutase
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan

# 1 Einleitung

Eisen ist eines der häufigsten Spurenelemente im Metabolismus eukaryotischer Zellen. Es ist an Funktionsproteine wie Hämoglobin oder Myoglobin gebunden und nimmt dort an vielfältigen Aufgaben des oxidativen Metabolismus teil.

Ist es in Verbindungen mit diesen Proteinen essentiell für deren Funktionsweise, so kann es andererseits in seiner freien, ungebundenen Form auch toxisch wirken.<sup>[1-4]</sup> In seiner „freien Form“, als  $\text{Fe}^{2+}$ , das heißt vergleichsweise schwach gebunden an niedermolekulare Liganden wie ADP, Citrat, etc., ist Eisen in der Lage Reaktionen einzugehen, bei denen hochreaktive Sauerstoffspezies entstehen können.<sup>[5, 6]</sup> Dieser „chelatisierbare Eisenpool“, der etwa 1% des Gesamteisens im Körper ausmacht, wird in entscheidendem Maße für unterschiedliche Zellschädigungsprozesse verantwortlich gemacht<sup>[7-11]</sup>.

Um eine Aussage darüber treffen zu können, in welchem Maße chelatisierbares Eisen für die angesprochene Zellschädigung verantwortlich ist, und vor allem ab welcher Konzentration die zelleigenen Schutzmechanismen nicht mehr greifen, wurde nach einer Möglichkeit gesucht, diesen Pool zu quantifizieren. Im Anfang dieser Arbeiten stand die Verwendung von Fluoreszenzsonden, welche in der Lage waren, den Gesamtpool redoxaktiven Eisens einer Zelle zu erfassen. Es konnte jedoch keine genaue Aussage über die Verteilung des redoxaktiven Eisens in den einzelnen Kompartimenten der Zelle gemacht werden. Mittlerweile sind spezifische Sonden entwickelt worden, mit deren Hilfe es möglich ist, den Eisenpool in Mitochondrien und im Cytosol zu quantifizieren.<sup>[12, 13]</sup>

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die genauere Charakterisierung des mitochondrialen Eisenpools und die Entwicklung von Fluoreszenzsonden für weitere Kompartimente der Zelle

## 1.1 Eisenstoffwechsel

Eisen in Lösung kann in verschiedenen Formen und Oxidationsstufen vorliegen. Bei neutralem pH-Wert liegt es in seiner oxidierten Form Fe(III) als  $\text{Fe}(\text{OH})_3$  vor, welches mit einem Löslichkeitsprodukt von  $L_P = 10^{-37} \text{ mol}^4\text{L}^{-4[5]}$  praktisch unlöslich und somit nicht bioverfügbar ist.<sup>[14-16]</sup>

Die Bioverfügbarkeit von Eisen in Bakterien und Pflanzen wurde durch die Isolierung von Siderophoren ermöglicht.<sup>[16, 17]</sup> Siderophore sind starke Fe(II)-Chelatoren, die durch ihre lipophilen Reste in der Lage sind, Eisen durch Zellmembranen zu transportieren. Beispiele für solche Siderophore sind Desferrioxamin und Desferrichrom.

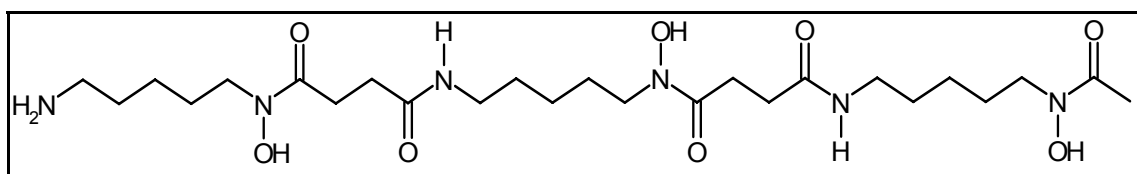


Abbildung 1 : Desferrioxamin b

In der Medizin werden Siderophore wie Desferrioxamin bei der Behandlung von Eisenspeicherkrankheiten eingesetzt, da sie aufgrund ihrer hohen Komplexbildungskonstante ( $\log \beta_3 = 30.6$ )<sup>[16]</sup> in der Lage sind, Eisen in der Zelle zu chelatisieren.

Der menschliche Körper ist auf eine Eisenzufuhr von außen, also durch Nahrung angewiesen. Eisen in seiner gebundenen Form, wie man es zum Beispiel im Hämoglobin oder im Myoglobin findet, wird durch den menschlichen Körper wesentlich besser aufgenommen als Eisen, welches aus pflanzlicher Nahrung stammt. Im zellulären Metabolismus ist Eisen mit 35-45 mg pro Kilogramm Körpergewicht eines der häufigsten Spurenelemente.<sup>[18, 19]</sup> Der überwiegende Teil liegt proteingebunden vor. Im Hämoglobin findet sich mit 70% der größte Anteil des Gesamteisens wieder. Weitere 19% sind in Form von Speichereisen und Depoteisen im Ferritin und Hämosiderin gebunden. Die restlichen 11% findet man in Funktionsproteinen, wie Katalase, Myoglobin etc. Nur etwa 0.1 % sind im Transferrin gebunden, mit dessen Hilfe der

Transport in die Zelle stattfindet.<sup>[20]</sup> Obwohl Eisen für viele Prozesse im menschlichen Organismus essentiell benötigt wird, kann es dennoch toxisch wirken.

## 1.2 Rezeptorvermittelte Endocytose von Transferrin<sup>[21]</sup>

Durch die rezeptorvermittelte Endocytose (*receptor mediated endocytosis* RME) wird Eisen in die Zellen transportiert.<sup>[22, 23]</sup> Als Endocytose wird die Aufnahme von Materialien in Zellen über die Einstülpung der Plasmamembran und deren Transport in Endocytosevesikeln zu bestimmten intrazellulären Vesikeln bezeichnet. Man kann zwischen drei Arten der Endocytose unterscheiden. Bei der **Phagocytose** (siehe Abschnitt 1.6) werden partikuläre Substratteilchen von der Zelle aufgenommen; man spricht hier auch von „fressen“. Beispiele dafür ist die Aufnahme von Bakterien durch Fresszellen. Eine weitere Form der Endocytose ist die **Makropinocytose**, die die Aufnahme, bzw. „das Trinken“, von gelösten Substratteilchen bezeichnet. Die Aufnahme von spezifischen Substraten, wie in der rezeptorvermittelten Endocytose von Transferrin, bezeichnet man als **Mikropinocytose**. Diese kann entweder Clathrin-vermittelt oder nicht-clathrin vermittelt sein.

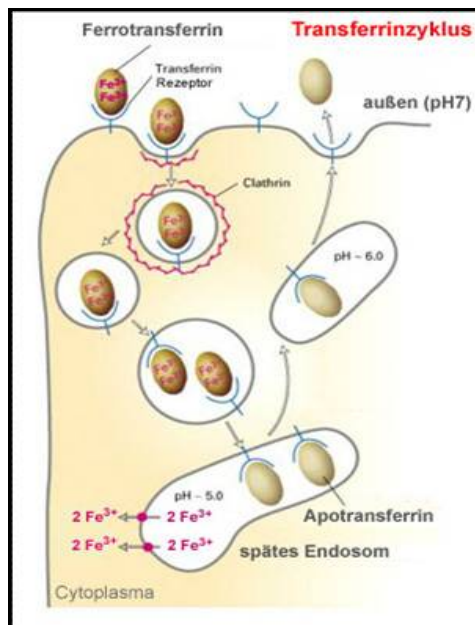


Abbildung 2 : Schematische Darstellung der rezeptorvermittelten Endocytose von Eisen

Die Rezeptoren für das Transferrin sammeln sich in spezialisierten Bereichen der Plasmamembran, den *coated pits*.<sup>[18]</sup> In den *coated pits* sind die Rezeptoren stark angereichert. Die Abschnitte sind mit einer Clathrin-Hülle umgeben und können sich ins Cytoplasma abschnüren, um dort „*coated vesicles*“ zu bilden. Die Clathrin-Hülle besitzt eine Schicht aus Adapterkomplexen, die zwischen dem Clathrin-Gerüst und dem Cytosol liegen. Die spezielle Funktion der  $\mu$ -Untereinheit des AP2-Adapters ist die Anreicherung der Rezeptoren in den coated pits. Sie enthält spezielle Plasmamembranrezeptoren, die dazu führen, dass sich auch der Transferrin-Rezeptor an diesen Stellen anreichert.

Nach der Aufnahme ins Zellinnere wird die Clathrinhülle abgestreift und der Vesikelinhalt durch ein dynamisches Netz aus Röhren (den Mikrotubuli) transportiert, um dann mit einem frühen Endosom zu verschmelzen. Durch eine in der Endosomenmembran enthaltene Protonenpumpe (H-ATPase) wird der pH-Wert in diesem Kompartiment auf pH 4-5 heruntergeregelt. Das saure Milieu verändert die Affinität des Transferrins zu  $\text{Fe}^{3+}$ , da die für die Bindung verantwortlichen Hydrogencarbonat- und Phenolatgruppen bei dem vorliegenden pH-Wert protoniert werden. Apotransferrin bleibt am Rezeptor gebunden.<sup>[24]</sup> Der Apo-Transferrin-Rezeptor-Komplex lagert sich in röhrenförmigen Bereichen des Endosoms an. Diese Bereiche schnüren sich ab und bringen den Komplex wieder zur Plasmamembran. Der pH-Wert an der Oberfläche beträgt 7.4 und bewirkt die Abspaltung des Apotransferrins vom Rezeptor, so dass es an einem weiteren Endocytose-Cyclus teilnehmen kann. Das freigesetzte Eisen wird durch den divalenten Metalltransporter DMT 1 aus dem Endosom ins Cytosol abgegeben.<sup>[25-28]</sup> Dort wird es zum größten Teil in Ferritin, einem cytosolischen Eisenspeicherprotein, eingebaut.

Die Synthese von Ferritin und vom Transferrin-Rezeptor wird vom Eisen selbst reguliert. Als Antwort auf einen Anstieg der Eisenkonzentration im Cytosol erhöht die Zelle die Synthese von Ferritin, damit dieses zur Chelatisierung zur Verfügung steht. Die Synthese des Transferrin-Rezeptors wird hingegen heruntergeregelt, so dass weniger Eisen in die Zelle importiert wird.

Diese Reaktionen werden durch das eisenerkennende Regulatorprotein Aconitase ausgelöst. Das Protein erkennt gemeinsame Eigenschaften in den Haarnadelstrukturen

der mRNAs (mitochondriale RNA) vom Ferritin und vom Transferrin-Rezeptor. Aconitase dissoziiert sofort von der mRNA, sobald es Eisen bindet und ermöglicht somit die Synthese von Ferritin und stoppt gleichzeitig die Synthese des Transferrin-Rezeptors. Umgekehrt regt es bei Abwesenheit von Eisen die Rezeptor-Synthese an und stoppt die Ferritin-Synthese.

### 1.3 Der chelatisierbare Eisenpool<sup>[29]</sup>

Das Eisen, welches durch Endocytose aufgenommen wurde (siehe Abschnitt 1.2), geht in einen sogenannten Übergangspool ein. Dort steht es zum Einbau in Funktionsproteine und Speicherung zur Verfügung. In der nachfolgenden Abbildung ist der chelatisierbare Pool schematisch dargestellt.

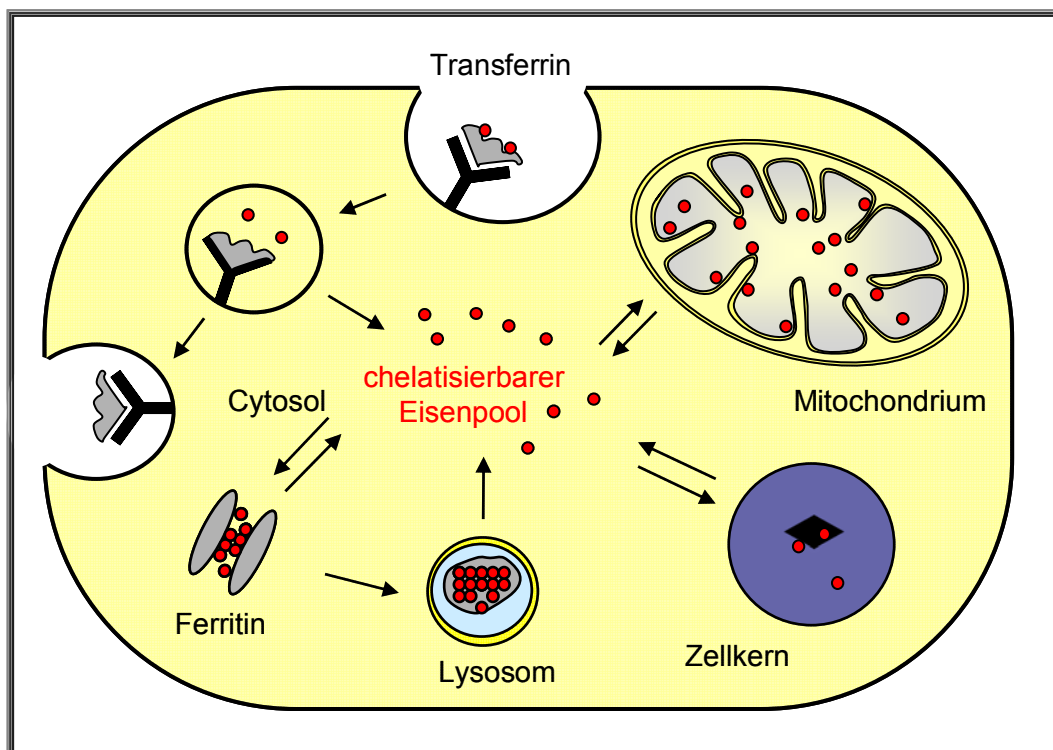


Abbildung 3 : Schematische Darstellung des zellulären chelatisierbaren Eisenpools

Eisen kann aber nicht nur von außen in diesen Pool gelangen, sondern auch als Folge des Ferritinabbaus entstehen.<sup>[30]</sup> Es wurde bestätigt, dass es nicht nur einen



cytosolischen Eisenpool gibt, sondern auch die Existenz eines solchen Pools in den Mitochondrien nachgewiesen. Während der Häm-Synthese erfolgt der Einbau von  $\text{Fe}^{2+}$  in das Protoporphyrin IX durch Ferrochelatase und der Einbau von  $\text{Fe}^{2+}$  in eisenhaltige mitochondriale Proteine, Fe/S-Cluster innerhalb der mitochondrialen Matrix. Der Abbau von Zellorganellen in den Lysosomen, also auch den enthaltenen, eisenhaltigen Proteinen, spricht für einen in den Lysosomen vorhandenen Eisenpool (1.6)

Für den chelatisierbaren Pool findet man in der Literatur verschiedene Namen wie chelatisierbares Eisen, Übergangspool oder auch LIP (labile iron pool). Im Weiteren wird aber die Bezeichnung chelatisierbares Eisen verwendet, da die durchgeführten Untersuchungen sich diese Eigenschaft zu Nutze machen. Das so bezeichnete Eisen liegt höchst wahrscheinlich gebunden an niedermolekulare Liganden wie ATP, Citrat oder Aminosäuren vor, oder ist an Makromoleküle wie den Membranlipiden locker assoziiert.<sup>[31, 32]</sup>

Im Gegensatz zu Eisen im Ferritin oder in anderen eisenbindenden Proteinen, in denen es als  $\text{Fe}^{3+}$  gebunden ist, sollte das Eisen im chelatisierbaren Eisenpool in seiner zweiwertigen Form  $\text{Fe}^{2+}$  vorliegen<sup>[33, 34]</sup>. Bei dem vorhandenen pH-Wert und dem anwesenden Sauerstoff in der Zelle sollte man eigentlich einen dreiwertigen Oxidationszustand des Eisens erwarten. Die Anwesenheit diverser Reduktionsmittel in hohen Konzentrationen und deren vermutlich enzymatische Wirkung erklärt den Redoxstatus des vorwiegend als  $\text{Fe}^{2+}$  vorliegenden Pools.<sup>[35]</sup> Das Eisen durchläuft fortwährend Oxidations- und Reduktionsreaktionen, in diesem Fall spricht man vom redox-cycling des Eisens.<sup>[33]</sup>

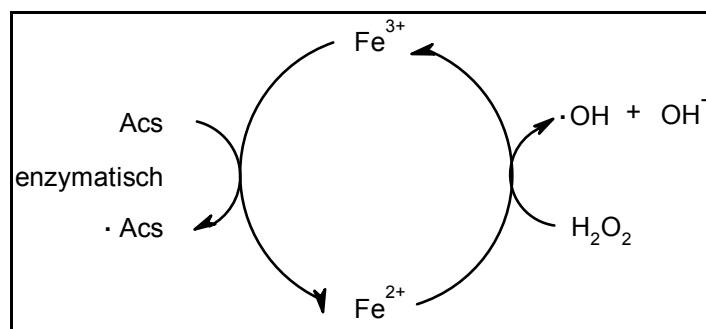


Abbildung 4 : Reduktion von Eisen am Beispiel Wasserstoffperoxid, Oxidation am Beispiel von Ascorbat (Acs.)

## 1.4 ROS (reactive oxygen species)<sup>[36, 37]</sup>

Eisen und oxidativer Stress stehen in direkter Verbindung, denn das chelatisierbare Eisen wird mit der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies ROS in Verbindung gebracht.<sup>[1, 11, 17, 38, 39]</sup>

Der in Zellen vorhandene molekulare Sauerstoff, kann für den Organismus gefährliche Sauerstoffspezies, wie Radikale, bilden. Ein Beispiel dafür ist das Hydroxylradikal, ein hochreaktives, freies Radikal, welches enormen Schaden an Biomolekülen anrichten kann. Die Quelle dieser ROS sind Enzyme wie die Xanthin-Oxidase, die NADPH-Oxidase und die Proteine der mitochondrialen Atmungskette (Abschnitt 1.5.1). Biologisch sehr wichtige ROS sind Wasserstoffperoxid  $H_2O_2$ , das Hydroxylradikal  $OH\cdot$ , das Superoxidradikalanion  $O_2^{\circ-}$ , Singulett-Sauerstoff und Peroxyl-Radikale  $ROO\cdot$ . Die Bildung dieser Spezies und die körpereigenen Abwehrmechanismen werden in den nachfolgenden Kapiteln näher erläutert.

Auf den Singulett-Sauerstoff und die ebenfalls in physiologischen Systemen auftretenden reaktiven Stickstoff-Sauerstoff-Spezies (NOS) wird im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter eingegangen, da sie im Zusammenhang mit der eisenvermittelten Schädigung keine essentielle Rolle einnehmen.

### 1.4.1 Bildung des Superoxidradikalanions<sup>[15]</sup>

Das Superoxidradikalanion  $O_2^{\circ-}$  entsteht durch Ein-Elektronen-Reduktion des Sauerstoffmoleküls im Grundzustand und hat eine Halbwertszeit von wenigen Millisekunden unter physiologischen Bedingungen.

Ein Beispiel für die Bildung des Superoxidradikalanions findet man im Abbau-mechanismus von Nucleotiden.<sup>[14]</sup> Da der menschliche Körper keine Möglichkeit hat Purin-Ringsysteme enzymatisch zu spalten, werden diese in Harnsäure umgewandelt und so aus dem Organismus entfernt. Ausgehend vom Adenosin findet zunächst eine Umsetzung zu Inosin statt. Aus Inosin wird durch Abspaltung von Ribose Hypoxanthin erhalten, welches durch Xanthinoxidase unter Bildung des Superoxidradikalanions in

Xanthin umgewandelt wird. Eine erneute Umsetzung des erhaltenen Xanthin mit der Oxidase liefert dann die Harnsäure, wobei erneut Superoxidradikalanionen gebildet werden. Ein Ausschnitt des Adenosin-Abbaus ist im folgenden aufgeführt.

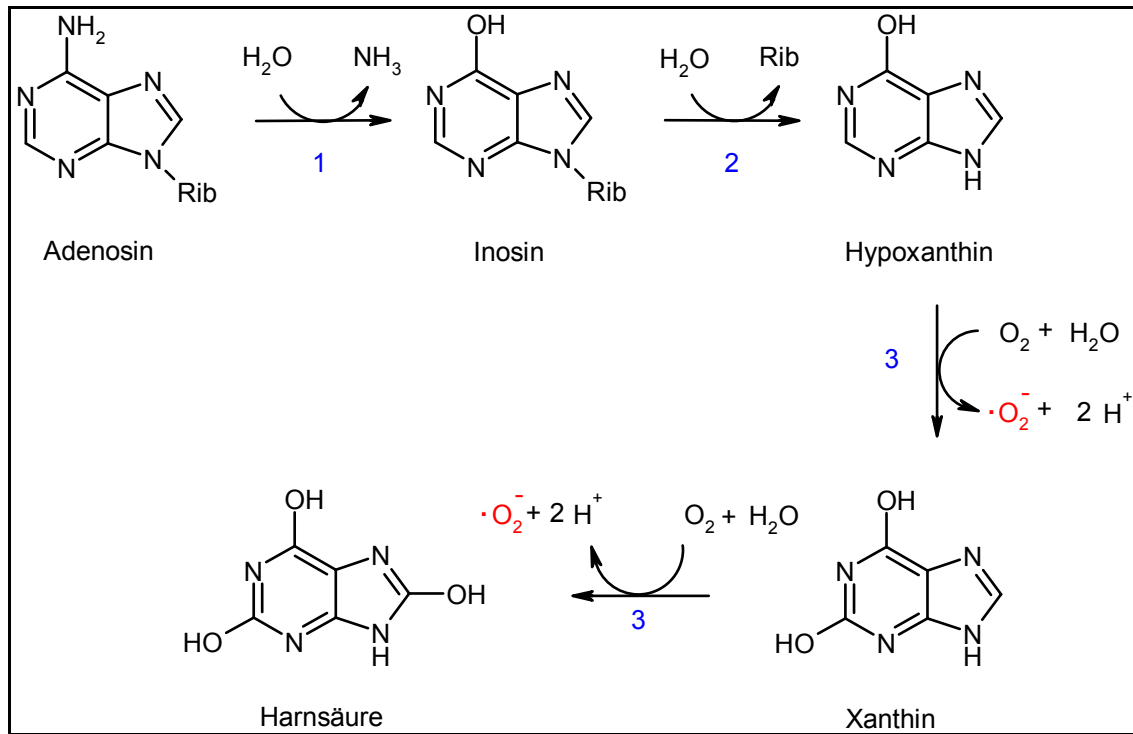


Abbildung 5 : Ausschnitt aus dem Purinabbau: **1**(Adenosin-Desaminase), **2** (Nucleosidphosphorylase), **3** Xanthinoxidase

Ein weiteres Beispiel für Bildung von  $\text{O}_2^{\cdot-}$  ist die in Abschnitt 1.5 erläuterte Fehlübertragung innerhalb der mitochondrialen Atmungskette. Die nachfolgende Abbildung zeigt einen Bildungsweg von Superoxidradikalanionen unter Einwirkung von Chinonen. Die carcinogene Wirkung von Chinonen und deren verwandte Verbindungen ist schon lange bekannt.<sup>[14]</sup>

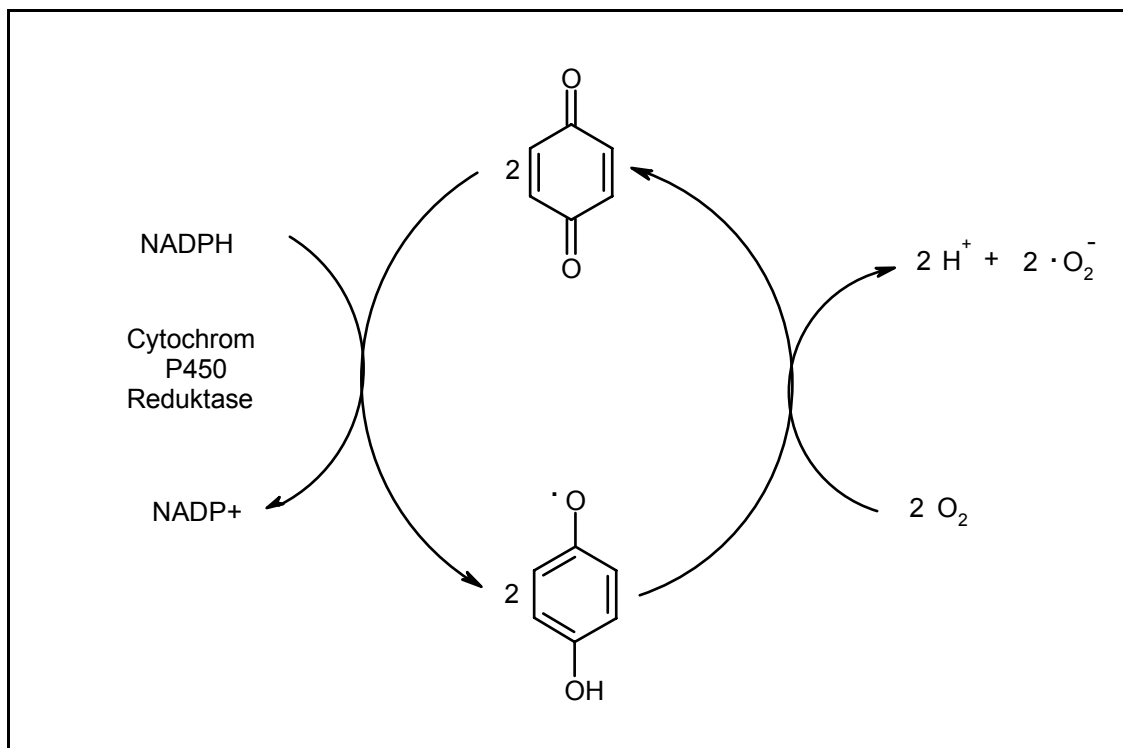


Abbildung 6 : Bildung von Superoxidradikalen bei der Reduktion von Benzochinon und Reoxidation des Semichinonradikalanions katalysiert durch Cytochrom-P<sub>450</sub>-Reduktase

Die wichtigste Verteidigungsstrategie der Zelle gegen die gebildeten Superoxidradikalanionen ist der enzymatische Abbau durch die Superoxid-Dismutase (SOD). Es erfolgt die Umwandlung zweier Radikale in Sauerstoff und Wasserstoffperoxid.<sup>[40]</sup>

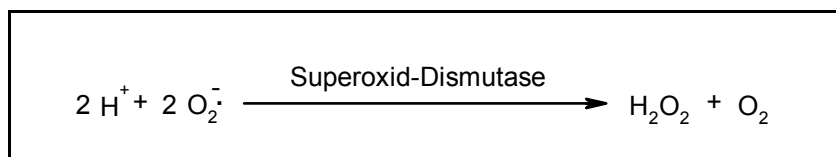


Abbildung 7 : Abbau von Superoxidradikalanionen zu Wasserstoffperoxid und Sauerstoff durch Superoxid-Dismutase

Eukaryoten enthalten zwei Formen des Enzyms; eine manganhaltige Form in den Mitochondrien und eine von Kupfer und Zink abhängige cytosolische Form.<sup>[41]</sup> Die

Dismutation verläuft in zwei Schritten und ist in der nachfolgen Abbildung schematisch dargestellt.

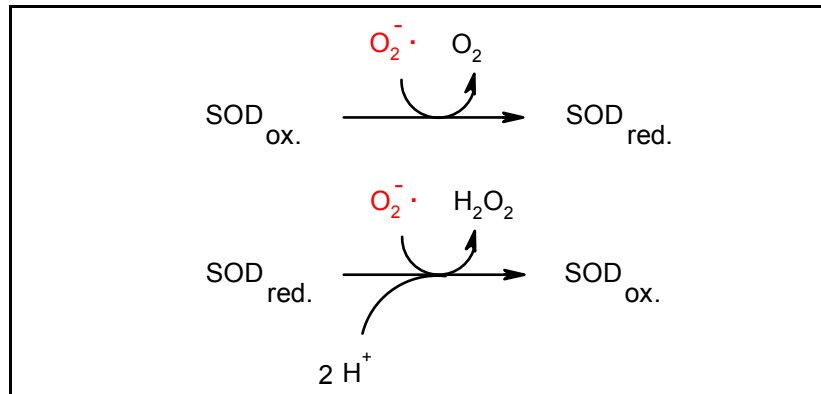


Abbildung 8 : Abbau von Superoxidradikalanionen durch Superoxid-Dismutase

Das entstehende Wasserstoffperoxid kann durch Katalase zu Wasser und Sauerstoff umgesetzt werden.

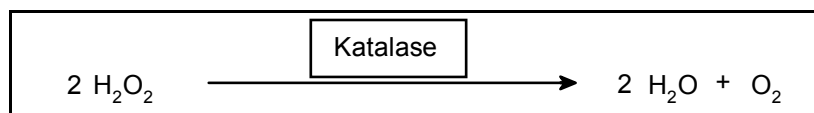


Abbildung 9 : Abbau von Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff durch Katalase

Alternativ kann eine Umsetzung mit Glutathionperoxidase erfolgen, ein Enzym, welches die Oxidation des Tripeptids Glutathion (GSH), bestehend aus Glutamat, Glycin und Cystein, zu Glutathiondisulfid (GSSG) katalysiert. Hierbei wird Wasserstoffperoxid reduziert und Wasser freisetzt.

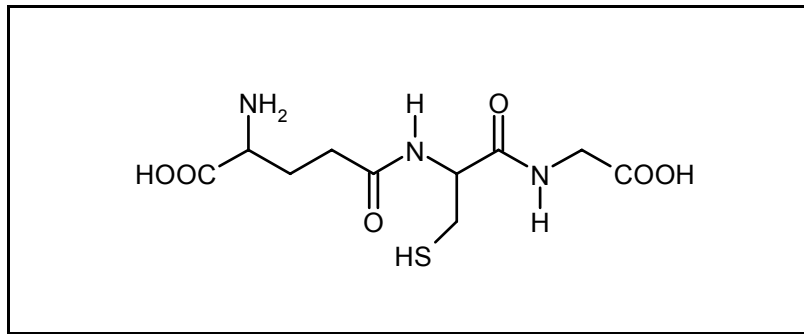


Abbildung 10 : Glutathion (GSH)

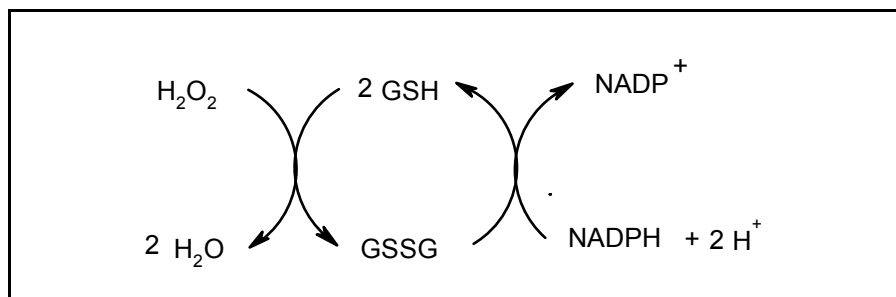


Abbildung 11 : Abbau von Wasserstoffperoxid durch Glutathion und Regenerierung durch NADPH

Das so entstandene Oxidationsprodukt Glutathiondisulfid wird in einem NADPH-verbrauchenden Prozeß durch Glutathion-Reduktase wieder zu Glutathion reduziert.

### 1.4.2 Das Hydroxyl-Radikal

Wasserstoffperoxid kann durch Ein-Elektronentransfer in das stark oxidierende OH-Radikal überführt werden. Das hohe Redoxpotential dieses Radikals erklärt seine Kurzlebigkeit in biologischen Systemen, da es mit fast jeder Art von Molekülen reagiert. In biologischen Systemen entstehen Hydroxylradikale primär durch  $\text{Fe}^{2+}$ -katalysierte Zersetzung von Wasserstoffperoxid.

Bei der Fenton-Reaktion wird aus Wasserstoffperoxid ein Hydroxidion und das Hydroxyl-Radikal gebildet, während  $\text{Fe}^{2+}$  zu  $\text{Fe}^{3+}$  oxidiert wird.<sup>[42]</sup>

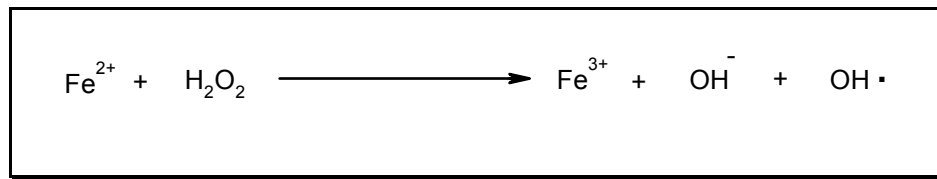


Abbildung 12 : Eisenvermittelte Hydroxylradikal-Bildung durch Reduktion von Wasserstoffperoxid

Das Superoxidradikalanion kann ebenfalls mit  $\text{Fe}^{2+}$  zum Hydroxylradikal reagieren. Die Haber-Weiss-Reaktion ist dabei die Summe der nachfolgenden Teilprozesse.<sup>[43]</sup>

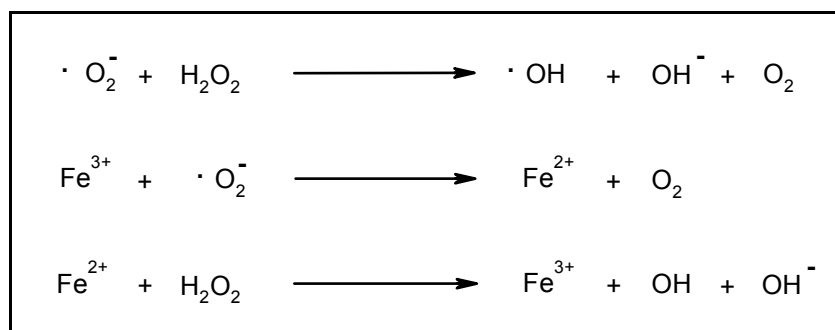


Abbildung 13 Haber-Weiss-Reaktion

Es konnte gezeigt werden, dass die nicht eisenvermittelte Reaktion zwischen Wasserstoffperoxid und dem Superoxidradikalanion praktisch nicht abläuft. Diese Reaktion wird als Hauptquelle für die Bildung von Hydroxylradikalen in der Zelle angenommen. Es gibt jedoch Überlegungen, welche sogenannte Ferryl-Spezies, in denen Eisen in der Oxidationsstufe (+IV) vorliegt, für die schädigenden Prozesse verantwortlich machen.

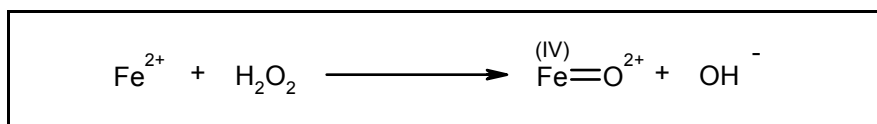


Abbildung 14 : Bildung von Ferrylspezies

Beide Spezies sind hochreaktiv und reagieren deshalb sofort an ihrem Entstehungsort mit umgebenden Biomolekülen. Der Abfang dieser Spezies ist deshalb auch äußerst

schwierig, da Radikalfänger kaum in der Lage sind, an allen Entstehungsorten gleichzeitig, in ausreichend hoher Konzentration vorzuliegen, um diese Radikale abzufangen.<sup>[44]</sup>

### **1.4.3 Schädigung durch ROS**

Wie bereits in den vorangegangenen Abschnitten erwähnt, werden unter normalen Bedingungen ROS z. B. in der mitochondrialen Atmungskette oder durch körpereigene Abwehrmechanismen gebildet. Reaktive Sauerstoffspezies sind in der Lage in Oxidationsreaktionen z.B. die Zellmembran, DNA und Proteine anzugreifen und so deren Funktion zu beeinträchtigen. Diese Veränderungen spielen eine große Rolle in der Pathogenese zahlreicher Erkrankungen.<sup>[45]</sup> Die Funktionseinschränkung der Zelle durch länger anhaltende Schädigung werden als Schlüsselprozesse des Alterungsprozesses angesehen. Die Bildung von ROS ist aber nicht immer unerwünscht, so töten Leukozyten mit Hilfe dieser Spezies Bakterien und Tumorzellen ab.

Im biologischen System sind zahlreiche antioxidative Verteidigungssysteme gegen die reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) vorhanden. Das Superoxidradikalanion kann wie in Abschnitt 1.4.1 erläutert durch Superoxiddismutase zu Wasserstoffperoxid abgebaut werden. Die im System ebenfalls vorhandene Katalase ist in der Lage, das gebildete Wasserstoffperoxid in Wasser und Sauerstoff umzusetzen. Ein weiterer Abwehrmechanismus ist das Vorhandensein verschiedener Vitamine wie Ascorbat (Vitamin C) und  $\alpha$ -Tocopherol (Vitamin E). Unter normalen physiologischen Bedingungen ist das System in der Lage, auf die Entstehung von ROS zu reagieren. Ist dieses Gleichgewicht jedoch gestört liegen die ROS im Verhältnis zum antioxidativen System im Überschuss vor, so spricht man vom „oxidativen Stress“.



### 1.4.3.1 Lipidperoxidation

Die Schädigung von ungesättigten Fettsäuren durch Hydroxylradikale ist ein besonders gut untersuchte Reaktion.<sup>[46-49]</sup> Ungesättigte Fettsäuren sind ein obligatorischer Bestandteil aller zellulären Membranen. Die Reaktion des Hydroxylradikals mit diesen Lipiden wird als Lipidperoxidation bezeichnet und ist im folgenden schematisch dargestellt. Die Wirkungsweise des membrangebundenen Antioxidans Vitamin E ist im mechanistischen Ablauf eingebunden.

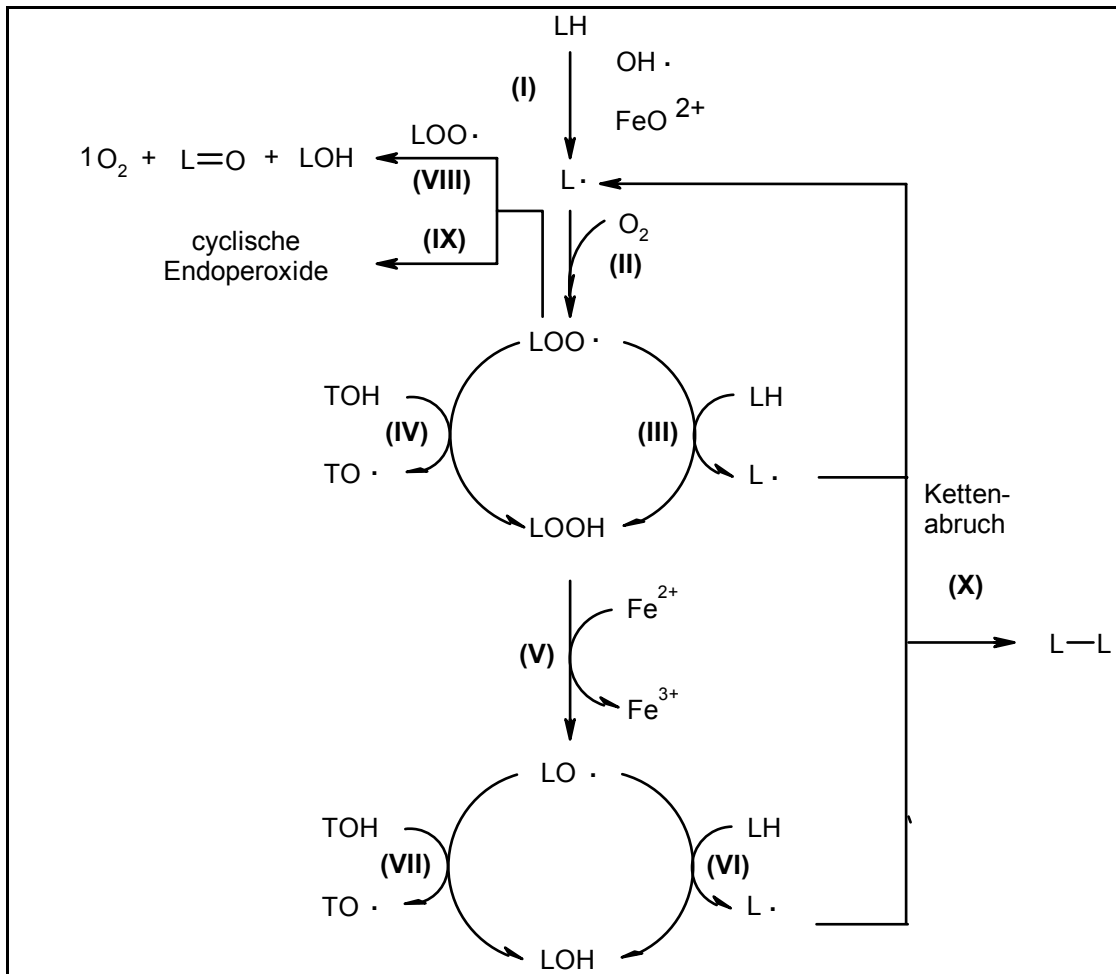


Abbildung 15 : Mechanismus der Lipidoxidation (LH) unter Einbezug des Antioxidans Vitamin E

Im ersten Schritt (I) der Radikalkettenreaktion initiiert ein Hydroxylradikal oder eine

Ferryl-Spezies die Reaktion der ungesättigten Fettsäure eines Membranlipides zum Lipidradikal ( $L\cdot$ ). Dieses Lipidradikal reagiert **(II)** mit Sauerstoff zum Lipid-Peroxyradikal ( $LOO\cdot$ ).

Das gebildete Radikal kann nun entweder **(III)** mit einer weiteren Fettsäure zum Lipid-Hydroperoxid ( $LOOH$ ) und einem neuen Lipidradikal reagieren oder **(IV)** mit dem membrangebundenen Antioxidans  $\alpha$ -Tocopherol ( $TOH$ ) reagieren, wobei das wenig reaktive Radikal des  $\alpha$ -Tocopherols ( $TO\cdot$ ) entsteht. Das Lipidhydroperoxid ( $LOOH$ ) kann jetzt eisenkatalysiert **(V)** zum Lipidoxylradikal ( $LO\cdot$ ) zerfallen und eine weitere Fettsäure angreifen **(VI)**. Aber auch dieses Radikal kann durch vorhandenes  $\alpha$ -Tocopherol **(VII)** abgefangen werden. Die Reaktion zweier Lipid-Peroxyradikale ( $LOO\cdot$ ) miteinander **(VIII)** kann dann zur Bildung von Singulett-Sauerstoff ( $^1O_2$ ), Triplettcarbonylen ( $^3L=O$ ) und Lipidhydroxiden führen. Das Radikal kann aber auch **(IX)** zu einem Endoperoxid zyklisieren. Durch die Reaktion zweier Radikale kann es auch jederzeit zu Kettenabbruchreaktionen kommen **(X)**.

Der Schutz der Membranen vor reaktiven ROS findet hauptsächlich über das in der Membran eingelagerte  $\alpha$ -Tocopherol statt. Hat sich das Peroxyradikal gebildet, so ist ein signifikanter Dipol in der lipophilen Kette entstanden. Durch Umorientierung des Peroxyradikals in Richtung der wässrigen Phase ist die Reaktion mit dem vorhandenen  $\alpha$ -Tocopherol möglich.

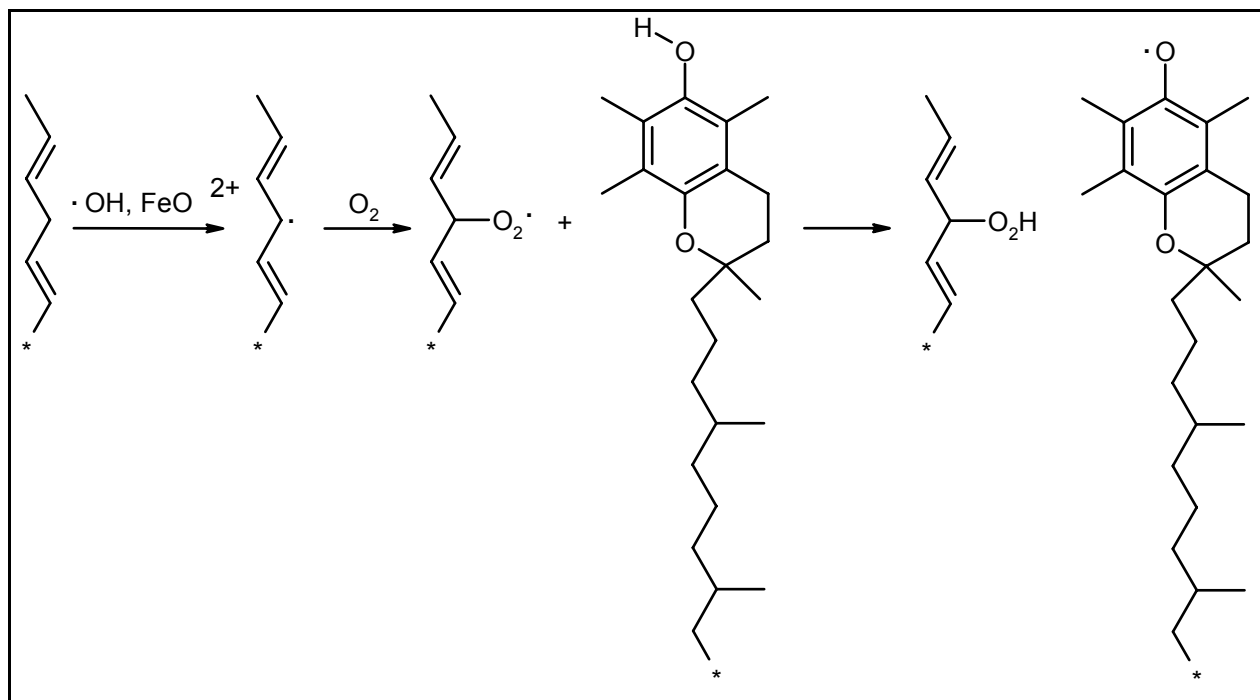


Abbildung 16 : Schematische Darstellung der Lipidperoxidation in biologischen Membranen und der mögliche Kettenabbruch durch Tocopherol.

Das entstehende, relativ persistente Radikal des  $\alpha$ -Tocopherols kann durch die im extrazellulären Raum vorhandene L-Ascorbinsäure regeneriert werden.

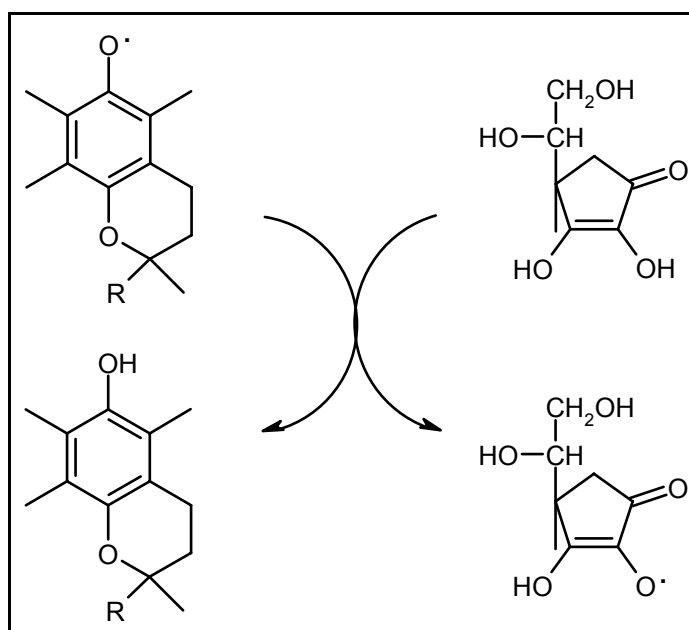


Abbildung 17 : Regeneration von Vitamin E durch L-Ascorbinsäure

Die im Extrazellulärraum vorhandene L-Ascorbinsäure wird dabei zum Ascorbylradikal oxidiert. Das Ascorbylradikal kann dann in Ascorbinsäure und Dehydroascorbinsäure disproportionieren. Sowohl das Ascorbylradikal als auch die Dehydroascorbinsäure können durch Enzyme, welche NADH und NADPH als reduktive Äquivalente benutzen, in Ascorbinsäure umgewandelt werden.

#### **1.4.3.2      Oxidative Schädigung von DNA<sup>[50-55]</sup>**

Die DNA ist nicht unbegrenzt stabil; zahlreiche schädigende Substanzen endogenen und exogenen Ursprunges tragen zum Zerfall oder zur Destabilisierung der DNA bei.<sup>[56, 57]</sup> Schätzungen haben ergeben, dass in einer einzelnen menschlichen Zelle etwa  $10^4$ - $10^6$  DNA-Schädigungsereignisse pro Tag stattfinden. Da bereits Änderungen weniger Basenpaare im Genom theoretisch zu Krebs führen können, müssen DNA-Reparaturmechanismen dieser Gefahr effizient entgegen wirken können. Dies ist in der Regel auch der Fall, da die Zelle über ein ausgefeiltes und sehr aktives nukleäres DNA-Reparatursystem verfügt.<sup>[58]</sup> Die Schädigung durch reaktive Sauerstoffspezies kann durch den Angriff auf das Zuckerrückgrad der DNA oder durch den Angriff an einer der vier Basen beginnen.

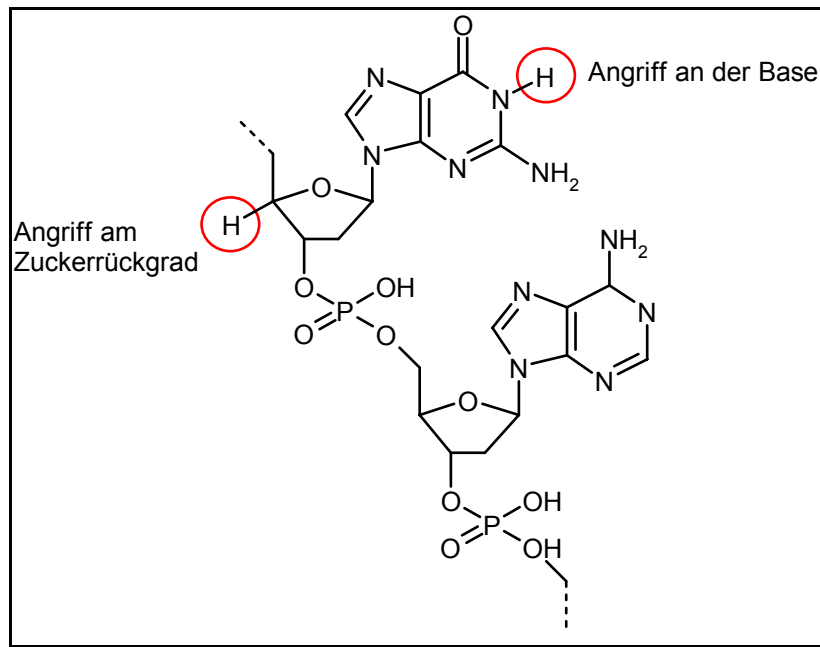


Abbildung 18 : Angriffspositionen für ROS an der DNA

Bei Angriffen an dem Zuckerrückgrad kann es zu Einzel- und Doppelstrangbrüchen kommen.<sup>[59]</sup> Schäden am Rückgrad der DNA entstehen vorwiegend durch Oxidation der Desoxyribose, die mehrere Stellen mit hoher Reaktivität gegenüber Sauerstoffradikalen enthält.<sup>[60]</sup> Das durch die Fenton Reaktion entstandene Hydroxylradikal ist in der Lage Wasserstoffatome von der Desoxyribose zu abstrahieren, wobei bestimmte Wasserstoffatome bevorzugt abgebaut werden.<sup>[61]</sup>

Der oxidative Abbau des Zuckerbausteines führt zu einer Reihe von Addukten, z.B. Oligonucleotiden mit einer 3'-Phosphatgruppe (A), einem 3'-Phosphoglycolat (B), oder einem 3'-Phosphoglycaldehyd (C), neben den komplementären Zuckerteilstrukturen. Der Typus der gebildeten Addukte hängt von der Position des abstrahierten Wasserstoffatoms im Zucker ab.

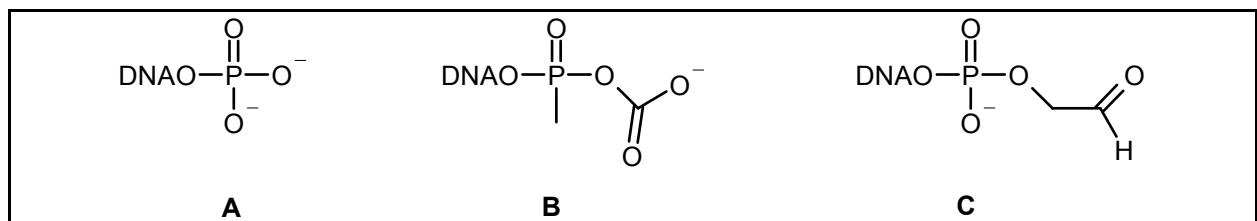


Abbildung 19 : Mögliche Oligonucleotide durch den oxidativen Abbau

Nicht nur das Riboserückgrat der DNA kann durch Radikale geschädigt werden, sondern auch die Nucleobasen. Es sind derzeit bis zu 100 Oxidationsprodukte identifiziert. Die bevorzugte Base bei diesen Oxidationen ist Guanin, da sie das niedrigste Oxidationspotential der vier Basen besitzt.<sup>[62]</sup>

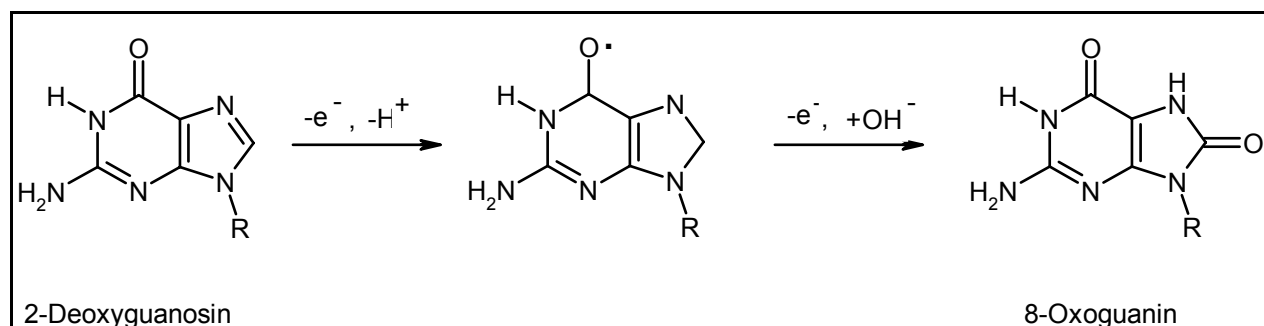


Abbildung 20 : Oxidation von Guanin mit Hydroxylradikalen zu 8-Oxoguanin

Durch den Angriff eines Hydroxylradikals und der nachfolgenden Oxidation wird das stark mutagen wirkende 8-Oxoguanin gebildet. Diese Oxidation führt bei der DNA-Replikation zum Einbau von Adenin und Cytosin in den Komplementärstrang und damit letztendlich zu G→T- Transversionen (Guanin→Thymin). Ein weiteres Oxidationsprodukt von Guanin in DNA ist Imidazolone. Auch dieses Oxidationsprodukt ist mutagen und man vermutet, dass es für die bei Fenton-Reagenzien beobachteten G→C-Transversionen (Guanin→Cytosin) verantwortlich ist.

Die in den Mitochondrien vorliegende mtDNA (mitochondriale DNA) ist besonders den Angriffen von Radikalen ausgesetzt.<sup>[45, 63]</sup> In der mitochondrialen Atmungskette kann es zu Fehlübertragungen von Elektronen kommen (siehe Abschnitt 1.5). Diese Elektronen sind in der Lage Sauerstoff zu Superoxidradikalanionen zu reduzieren, welche sich dann zu Wasserstoffperoxid umsetzen. Durch vorhandenes, chelatisierbares Eisen kann das entstandene Wasserstoffperoxid in der Fenton-Reaktion zu Hydroxylradikalen umgesetzt werden. Diese Radikale führen zu einer oxidativen Schädigung der mtDNA, die sich in einem Kontakt zur mitochondrialen Atmungskette befindet, da sie ebenfalls in der inneren Mitochondrienmembran zu finden ist. Durch fehlerhafte Expression der

Atmungskettenkomplexe kommt es wiederum zu weiterer ROS-Erzeugung, wodurch die Zerstörung der Mitochondrien noch erhöht wird.

## 1.5 Der chelatisierbare Eisenpool in Mitochondrien<sup>[14, 64, 65]</sup>

Mitochondrien sind in den meisten eukaryotischen Zellen zahlreich vorhanden. Dabei handelt es sich um hoch strukturierte zelluläre Organellen, die eine ellipsoide, gelegentlich auch kugelförmige Struktur besitzen. Diese Organellen sind 2-4  $\mu\text{m}$  lange und 1  $\mu\text{m}$  dicke Körperchen, die in sauerstoffverbrauchenden Zellen in unterschiedlicher Anzahl vorkommen. Zellen in Gewebe mit besonders hohem Substratdurchsatz und Sauerstoffverbrauch, wie Leber- und Herzmuskelzellen, enthalten daher eine besonders hohe Zahl dieser Organellen.

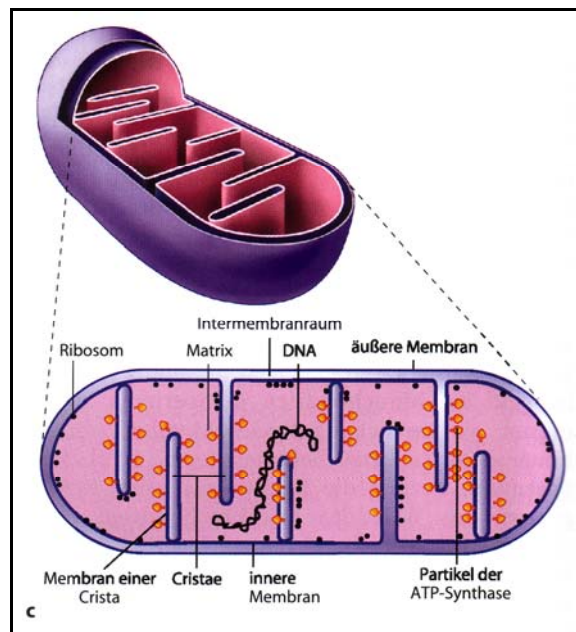


Abbildung 21 : Schematischer Aufbau eines Mitochondriums

Alle Mitochondrien besitzen zwei sich deutlich voneinander abhebende Membranstukturen, zum einen die Außenmembran, die das Mitochondrium vom Cytosol abgrenzt, sowie die Innenmembran. Die mitochondriale Außenmembran enthält eine Reihe von Poren und ist damit für viele Substanzen gut durchgängig. Die Innenmembran hingegen ist strukturierter. Sie besitzt zahlreiche Einstülpungen, die als

Cristae bezeichnet werden. Dies trägt zu einer enormen Vergrößerung der Membranoberfläche bei. In den Mitochondrien sind spezifische zelluläre Funktionen lokalisiert. In der mitochondrialen Matrix befinden sich u. a. die Enzyme der  $\beta$ -Oxidation der Fettsäuren, des Citratcyclus sowie Teile des Harnstoffcyclus. In der mitochondrialen Matrix erfolgen außerdem Teile der Hämsynthese, der Biosynthese von Fe-S-Clustern und die mitochondriale DNA-Replikation. Der größte Beitrag zur Energiegewinnung des Organismus erfolgt innerhalb der Mitochondrien. Die aufgenommenen Nährstoffe enthalten chemische Bindungsenergie, welche in dieser Form von der Zelle nicht verwertbar ist. Das geschieht vorwiegend durch eine Übertragung der Bindungsenergie auf organische Phosphorverbindungen, in der Hauptsache auf das ADP-ATP-System, das damit den universellen Energielieferanten für alle in der Zelle ablaufenden Stoffwechselprozesse darstellt. Diese Umwandlung findet hauptsächlich in den Mitochondrien statt.

Beim Abbau von Kohlenhydraten, Fetten und Aminosäuren entstehen Acetylgruppen, welche auf Coenzym A übertragen werden. Das entstandene Acetyl-Coenzym A geht in den Citronensäurecyclus ein, dessen beteiligte Enzyme in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert sind. Im Anschluss findet der vollständige Abbau des Acetyl-Coenzym A zu Kohlenstoffdioxid und Wasserstoff statt. Das Kohlendioxid wird zum größten Teil über Körperflüssigkeit und die Atmungsorgane abgegeben. Der Wasserstoff wird auf die Oxidoreduktasen  $\text{NAD}^+$  und Flavin-Adenin-Dinucleotid (FAD) übertragen, die dann in reduzierter Form in die Atmungskette eingehen.

Das  $\text{NAD(P)H}$  bzw.  $\text{FADH}$  überträgt den Wasserstoff in einer exergonen Reaktion auf den im System vorhandenen Sauerstoff unter Bildung von Wasser. Diese Übertragung verläuft über eine Reihe von Enzymen, den Cytochromen, die als eine Kaskade, die sogenannte Atmungskette, von Redox-Systemen aufgefasst werden kann.



Beim Ablauf der Atmungskette kann es durch Fehlübertragungen von Elektronen (1-3%) zur Bildung des Superoxid-Radikalanions kommen (siehe Abschnitt 1.4.1).

Die bei der Atmungskette frei werdende Energie ist in drei unterschiedliche Energiepakete aufgeteilt. Diese Energien werden zunächst in den Mitochondrien zur Translokation von Protonen vom Matrix- in den Innenmembranraum und später zur Umwandlung von ADP (Adenosindiphosphat) und anorganischem Phosphat in das energiereiche ATP (Adenosintriphosphat) genutzt. Dieser mit der Atmungskette eng gekoppelte Prozess wird oxidative Phosphorylierung genannt.

Da die innere Mitochondrienmembran für Ionen, besonders für Protonen, nicht permeabel ist entsteht ein Ladungs- und pH-Gradient über der inneren Mitochondrienmembran, eine sogenannte elektrochemische Potentialdifferenz. Diese Potentialdifferenz wird von der ATP-Synthase zur Phosphorylierung von ADP genutzt.

Die Bildung der Superoxidradikalanionen und die in Gegenwart von chelatisierbarem Eisen ablaufende Bildung von Hydroxylradikalen, führt wie bereits beschrieben (1.4.3.2) zur Schädigung der mtDNA. Die Mutationen stehen in einem engen Zusammenhang mit neurodegenerativen Erkrankungen wie Parkinsonsche Krankheit, Morbus Huntington oder Morbus Alzheimer.<sup>[45, 66-68]</sup>

## **1.6 Lysosomen und Endosomen<sup>[64, 69]</sup>**

In allen Zellen findet ein kontinuierlicher Umsatz aller ihrer Makromoleküle und der Organellen statt. Analog zur extrazellulären Verdauung spielen dabei Enzyme verschiedenster Art eine Rolle. Die so abgebauten Grundbausteine werden entweder in den Energiekreislauf der Zelle eingehen oder beim Einbau in neue Makromoleküle Verwendung finden. Die für die intrazelluläre Verdauung benötigten Enzyme befinden sich in spezifischen Organellen, den Lysosomen. Lysosomen stellen sich als membranbegrenzte, morphologisch sehr heterogene Strukturen dar, die ungefähr 50 verschiedene hydrolytische Enzyme enthalten<sup>[18]</sup>. Zusammen können die Lysosomenenzyme praktisch alle biologischen Makromoleküle hydrolysieren.

Alle Enzyme eines Lysosoms haben gemein, daß ihr Aktivitätsoptimum im sauren pH-Bereich liegt, es handelt sich also um saure Hydrolasen. Das pH-Optimum passt zum niedrigen pH im Lysosomenkompartiment, der bei ungefähr 4.6 liegt. Diese hohe innere Protonenkonzentration wird durch eine Protonenpumpe, eine  $H^+$ -ATPase, aufrechterhalten, die in der Membran des Organells angesiedelt ist. Lysosomenmembranen enthalten verschiedene stark glycolisierte integrale Proteine, deren Kohlenhydratketten vermutlich eine schützende innere Auskleidung bilden, welche die Membran vor Angriffen durch die in ihr eingeschlossenen Proteine abschirmt. Die Beobachtung, dass es in der Zelle ein Organell gibt, welches mit „Zerstörungsproteinen“ gefüllt ist, legt als potentielle Funktion den Abbau von zellfremdem bzw. zelleigenem Material nahe.

Eine wichtige Rolle spielen Lysosomen beim Umsatz der Organellen, das heißt bei ihrem kontrollierten Abbau und Austausch. Dieser Vorgang, der auch Autophagie genannt wird, ist in der nachfolgenden Abbildung schematisch dargestellt.

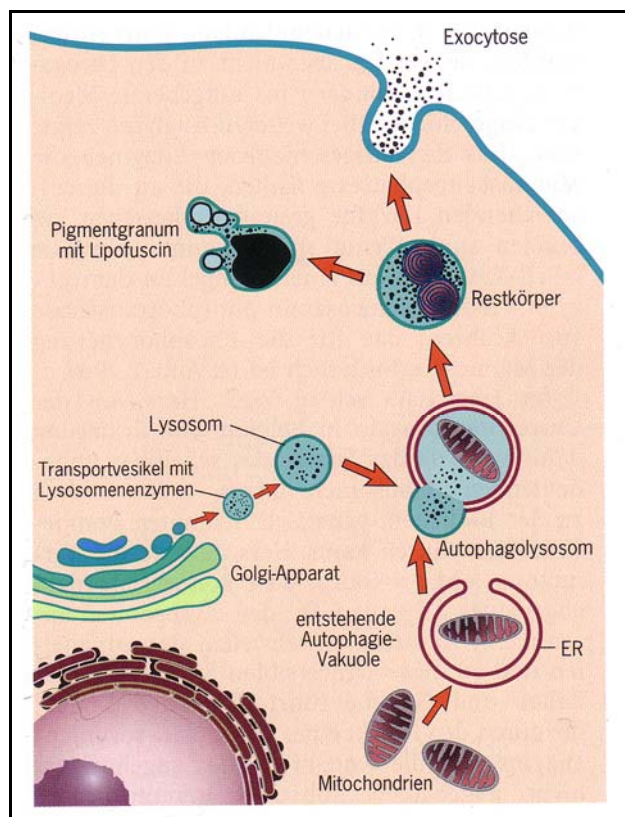


Abbildung 22 : Autophagie eines Mitochondriums in der Zelle

Ein Organell, beispielsweise ein Mitochondrium, wird in eine Doppelmembran eingeschlossen, die von einer ER-Zisterne (Lumen des endoplasmatischen Retikulums) stammt. Anschließend verschmilzt die Doppelmembran mit einem Lysosom, wobei ein Autophagolysosom entsteht. Das Lysosom wird im Golgi-Apparat gebildet und enthält hieraus auch die benötigten Lysosomenenzyme. In den Leberzellen von Säugetieren durchläuft nach Berechnungen ungefähr alle zehn Minuten ein Mitochondrium die Autophagie. Leidet die Zelle unter Nährstoffmangel, beobachtet man diesen Vorgang deutlich häufiger. Unter solchen Bedingungen verschafft sich die Zelle die Energie zum Lebensunterhalt, indem sie ihre eigenen Organellen zerstört.

Ist der Verdauungsvorgang im Autophagolysosom abgeschlossen, bezeichnet man das Organell als Restkörper. Je nachdem, um was für einen Zelltyp es sich handelt, wird sein Inhalt durch Exocytose aus der Zelle ausgeschleust oder bleibt als Lipofuscingranum unbegrenzt lange im Cytoplasma. Die Zahl der Lipofuscingrana wächst mit zunehmendem Alter des Individuums. Besonders auffällig ist diese Anhäufung in Neuronen und anderen langlebigen Zellen. Die Anhäufung gilt als charakteristisches Kennzeichen der Alterung.

Es können aber nicht nur Organellen aus dem Zellinneren der Zelle phagocytiert werden, sondern auch Teilchen aus der Zellumgebung. Auf die Phagocytose solcher relativ großen Teilchen (Durchmesser über 0,5  $\mu\text{m}$ ) aus der Umgebung haben sich einige Zellen, wie Makrophagen und Neutrophile spezialisiert. Diese Zellen wandern durch Blut und Gewebe und nehmen eingedrungene Mikroorganismen, beschädigte und sterbende Zellen sowie Abfallstoffe auf. Nach der Verschmelzung mit einem Lysosom bildet sich ein Phagolysosom und der Inhalt kann enzymatisch abgebaut werden.

## **1.7 Der chelatisierbare Eisenpool in den Lysosomen/ Endosomen**

Wie bereits erläutert findet ein kontinuierlicher Abbau von zelleigenem und zellfremdem Material in den Lysosomen statt. Es ist also davon auszugehen, dass in den Lysosomen eine große Anzahl von eisenhaltigen Enzymen und Proteinen, wie Hämoglobin, Ferritin usw. vorhanden ist, welche von den sauren Hydrolasen abgebaut werden. Ein

bekanntes Abbauprodukt ist das Hämosiderin, welches wahrscheinlich ein Kondensationsprodukt von Apoferritin und Zellbestandteilen wie Nucleotiden oder Lipiden ist.

Die rezeptorvermittelte Endocytose findet mit Hilfe von Endosomen statt, welche später mit Lysosomen verschmelzen. Das so aufgenommene Eisen wird freigesetzt und in das Cytosol abgegeben.

Die Annahme, dass es sich bei diesen sauren Organellen um Kompartimente mit einem großen chelatisierbaren Eisenpool handelt, ist also nicht unbegründet.<sup>[70, 71]</sup>

Wird die Zelle erhöhtem oxidativen Stress durch Zugabe von Wasserstoffperoxid ausgesetzt, kommt es zur Schädigung der Organellmembranen. Die Schädigung beruht hauptsächlich auf der bei der Fenton-Reaktion erfolgenden Freisetzung von Hydroxylradikalen (siehe Abschnitt 1.4.2). Dies hat bei Endosomen und Lysosomen die Freisetzung der sauren Hydrolasen aus den Kompartimenten in das Cytosol zur Folge. In der Literatur<sup>[71-73]</sup> wird davon ausgegangen, dass die Freisetzung des in den Lysosomen vorhandenen chelatisierbaren Eisens die entscheidende Rolle bei der Schädigung der Zelle spielt. Vor allem die oxidative Schädigung der DNA soll hierbei von dem in den Lysosomen vermutlich enthaltenem chelatisierbaren Eisen zustande kommen. In der Literatur wurde beschrieben, dass sowohl die Apoptose wie auch die Nekrose durch Zugabe diverser Eisenchelatoren<sup>[74]</sup> z. B. Desferal unterbunden werden konnte.<sup>[75]</sup> Da aufgenommenes Desferal nicht nur in den lysosomalen/endosomalen Kompartimenten der Zelle vorliegt, sondern auch im Cytosol, wurde ein Desferal-Komplex verwendet. Dieser HMM-DFO-Komplex (hochmolekulares Desferal), welcher ein hydroxyliertes Stärkerückgrat und eine Masse von etwa 75 kDa besitzt, sollte lediglich über Mikropinocytose aufgenommen werden können. So sollte sichergestellt werden, dass lediglich der endosomale, lysosomale chelatisierbare Eisenpool erfasst wird. Nach Inkubation mit dem HMM-DFO-Komplex konnte tatsächlich eine protektive Wirkung erzielt werden. Die Begründung hierfür sollte die ausschließliche Akkumulation des HMM-DFO in den gewünschten Kompartimenten und Komplexierung des chelatisierbaren Eisenpools in diesen Organellen sein.

## 1.8 Fluoreszenzspektroskopie<sup>[76]</sup>

Bei der Wechselwirkung eines Moleküls mit elektromagnetischer Strahlung kann das Molekül kurzzeitig Energie aufnehmen und vom Grundzustand in einen elektronisch angeregten Zustand überführt werden. Welcher Art diese Anregung ist, hängt entscheidend von der Wellenlänge der Strahlung und den möglichen Quantenzuständen des Moleküls ab. Die Energie, die dabei vom Molekül aufgenommen wird, reicht oftmals aus, um chemische Bindungen zu spalten, photochemische Reaktionen einzuleiten und einen Elektronentransfer zu bewirken. Die Desaktivierung der elektronischen Anregung kann aber auch zerstörungsfrei durch Aussendung eines Photons oder Umwandlung in Wärme erfolgen. In der nachfolgenden Abbildung wird eine Übersicht über die möglichen Anregungen und die strahlenden und strahlungslosen Prozesse gegeben.

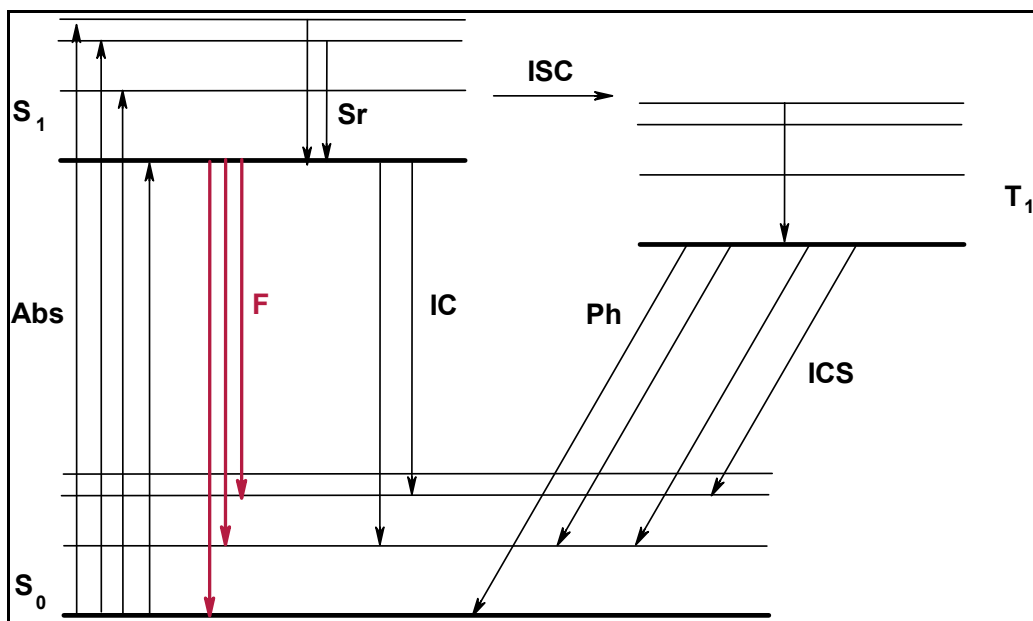


Abbildung 23 : Ausschnitt aus einem Jablonski-Diagramm

Durch die Absorption eines Photons mit geeigneter Energie ( $Abs$ ) kann das Molekül aus seinem Singulett-Grundzustand ( $S_0$ ) in einen elektronisch sowie schwingungsangeregten Singulett-Zustand (z. B.  $S_1$ ) übergehen. Der angeregte Zustand existiert nur für einen definierten Zeitraum. Das Molekül kann in diesem Zeitraum Wechselwirkungen

mit seiner Umgebung eingehen. Eine der Konsequenzen dieser Interaktion ist die Abgabe von Schwingungsenergie durch einen strahlungslosen Relaxationsprozess ( $S_R$ ), in den Schwingungsgrundzustand des elektronisch angeregten Zustandes. Danach kann es, durch Lichtemission zu einem vertikalen Übergang in den Grundzustand  $S_0$  kommen. Dieser Vorgang wird als Fluoreszenz (F) bezeichnet. Die alternativen Prozesse wie die strahlungslose Desaktivierung in den Grundzustand (IC internal conversion) oder der Übergang in den Triplettzustand (ICS intersystem crossing), stehen in direkter Konkurrenz zur Fluoreszenz.

Die Konkurrenzreaktionen der Fluoreszenz führen zu einer Verminderung der Quantenausbeute ( $\theta$ ). Die Quantenausbeute ist proportional der Fluoreszenzintensität  $I_F$  einer Farbstofflösung. Die Fluoreszenzintensität kann durch das Produkt der Quantenausbeute und der Differenz, welche sich aus Intensität des eingestrahlt Lichtes  $I_0$  und der Intensität des durchgelassenen Lichtes  $I_D$  ergibt, berechnet werden.

$$I_F = \theta (I_0 - I_D)$$

Mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes

$$I_D = I_0 10^{-\epsilon c d}$$

kann die Intensität des durchgelassenen Lichtes  $I_D$  durch die Intensität des eingestrahlt Lichtes der Konzentration der gelösten Substanz  $c$ , der Schichtdicke  $d$  und dem molaren Extinktionskoeffizienten bestimmt werden. Substituiert man  $I_D$  in der oberen Gleichung durch den Ausdruck aus dem Lambert-Beer'schen Gesetz ergibt sich folgender Ausdruck für die Fluoreszenzintensität des Farbstoffes:

$$I_F = \theta \cdot I_0 (1 - 10^{-\epsilon c d})$$

Die Fluoreszenzintensität kann demnach direkt aus der Konzentration der gelösten Substanz berechnet werden.

Die Fluoreszenz einer Verbindung kann durch verschiedene Gegebenheiten beeinflusst bzw. gelöscht werden. Bei der Bildung von Dimeren kann es zu Konzentrations- bzw. Eigenlöschung kommen. Sind die Monomere der Farbstoffe noch zur Fluoreszenz befähigt, so können Dimere der Verbindung Anregungszustände besitzen, welche durch strahlungslose Desaktivierung in den Grundzustand zurückkehren können. Die Dimerenbildung ist von der Konzentrationen des Fluorophors und der Art des Lösungsmittels abhängig. Die Anwesenheit von Fremdmolekülen kann ebenfalls zu einer Löschung der Fluoreszenz führen. So können im angeregten Zustand Wechselwirkungen und auch Reaktionen mit Fremdmolekülen auftreten, welche die Abgabe der Energie in Form von Fluoreszenz mindern oder auch aufheben können. Ein wichtiger Effekt, der in der Fluoreszenzspektroskopie auch häufig ausgenutzt wird, ist FRET (fluorescence resonance energy transfer). Dabei werden die interessierenden Stellen in einem Biomolekül mit zwei unterschiedlichen Fluorophoren verknüpft. Ein Fluorophor dient als Donor, der andere als Akzeptor. Die Absorption des Donors liegt bei höherer Frequenz als die des Akzeptors. FRET bedeutet, dass die Singulett-Singulett Übergänge der Sonden miteinander in Resonanz stehen. Die Anregungsenergie wird so vom Donor auf den Akzeptor übertragen. Normalerweise würde die Anregungsenergie des Donors über Fluoreszenz abgeben, in Gegenwart des Akzeptors erfolgt aber die Übertragung der Energie auf den Akzeptor. Die Fluoreszenz des Donor wird somit deutlich schwächer, man spricht dann von Löschung bzw. Quenchung der Fluoreszenz. Die Löschung ist umso stärker je besser der Energietransfer vom Donor auf den Akzeptor ist. Die übertragene Energie führt zur elektronischen Anregung des Akzeptors. Fluoresziert dieser nicht, so wird die Energie strahlungslos abgegeben. Gibt der Akzeptor seine Anregungsenergie in Form von Fluoreszenz ab, so geschieht dieses meist bei einer deutlich längeren Wellenlänge.

Der für diese Arbeit entscheidende Effekt ist die statische Fremdlöschung durch Komplexierung von Metallionen, speziell Eisen. Durch die Anbindung eines Chelators (siehe Abschnitt 1.9) an ein zur Fluoreszenz befähigtes System ist ein direkter Einfluss des Chelators auf die Fluoreszenzeigenschaften der Verbindung gewährleistet. Die Komplexierung von Eisenionen durch die Verbindung führt zur angesprochenen statischen Fremdlöschung der Fluoreszenz. Dieser Effekt der Fluoreszenzlöschung wird

auch als Schweratomeffekt bezeichnet. Der angeregte Zustand des Fluorophors tritt mit dem Schwermetall in Wechselwirkung. Dies hat eine Erhöhung der Spin-Bahn-Kopplung zur Folge, was eine Aufhebung des Spinverbotes und ein vermehrtes ISC ermöglicht. Durch die Besetzung des Triplettzustandes kann die aufgenommene Energie strahlungslos abgegeben werden (siehe Abbildung 24). Der Aufbau solcher Verbindungen, welche durch die Chelatisierung von Eisen eine Fluoreszenzlöschung erfahren, wird im folgendem Abschnitt näher erläutert.

## 1.9 Quantifizierung des chelatisierbaren Eisens

Die Quantifizierung des chelatisierbaren Eisenpools war mit den bis dahin geltenden Bestimmungsmethoden aus methodischen Gründen äußerst schwierig. Bei den disruptiven Methoden wurde das biologische Material entweder homogenisiert oder lysiert, um im Anschluß die eigentliche Quantifizierung durchzuführen. Es gab Bestimmungen von Eisen-Chelatkomplexen, die durch Zugabe verschiedener Liganden zur aufbereiteten Probe erhalten wurden. Diese Komplexe wurden dann mit Hilfe der HPLC<sup>[77, 78]</sup> oder verschiedener spektroskopischer Verfahren<sup>[79, 80]</sup> untersucht.

Durch die Zerstörung der Zellen konnte aber auch fest gebundenes Eisen freigesetzt werden, was im folgenden für nicht korrekte Werte sorgen konnte. Das dies ein Problem darstellte, zeigten z. B. die ermittelten Werte für chelatisierbares Eisen bei Lebergewebe (Hepatozyten), diese reichten von 3.5 bis 231  $\mu\text{M}$ .<sup>[70, 78-80]</sup>

Neuere Verfahren zur Quantifizierung des chelatisierbaren Eisenpools in Kompartimenten der Zelle beruhen auf der Verwendung von Fluoreszenzsonden. Diese Methode hat, im Gegensatz zu den vorangegangenen, den Vorteil, eine Quantifizierung direkt in der Zelle ohne Zerstörung vorzunehmen.

Durch fluoreszenzmikroskopische Methoden ist es möglich auch geringe Mengen an chelatisierbarem Eisen in der Zelle zu erfassen.<sup>[81-83]</sup> Werden die Fluoreszenzsonden in die Zelle eingebracht, so kann ihre Fluoreszenz durch das vorhandene chelatisierbare Eisen gelöscht werden. Durch die Zugabe eines membrangängigen, nicht



fluoreszierenden Eisenchelators in großem Überschuss wird dann das Eisen von der Sonde entfernt und die Löschung wird wieder aufgehoben. Als Folge der Zugabe des zweiten Chelators, auch „Entquencher“ genannt, steigt die Fluoreszenzintensität wieder an. Aus diesem relativen Anstieg lässt sich durch Verwendung einer Kalibrierungsgraden die Menge des chelatisierten Eisens quantifizieren. Bislang konnte der chelatisierbare Eisenpool im Cytosol mit Hilfe der Fluoreszenzsonde „Phen Green SK“ und der chelatisierbare Eisenpool in den Mitochondrien mit den Fluoreszenzsonden „RDA“ und „RPA“ bestimmt werden.

Fluoreszenzsonden bestehen meist aus drei bzw. vier Bausteinen. Die erste Komponente ist das fluorophore System, welches für die jeweiligen Organellen unterschiedlich ausfallen kann. Der Spacer, der das Fluorophor mit dem Chelator verbindet ist optional. Der schematische Aufbau ist in der nachfolgenden Abbildung dargestellt.

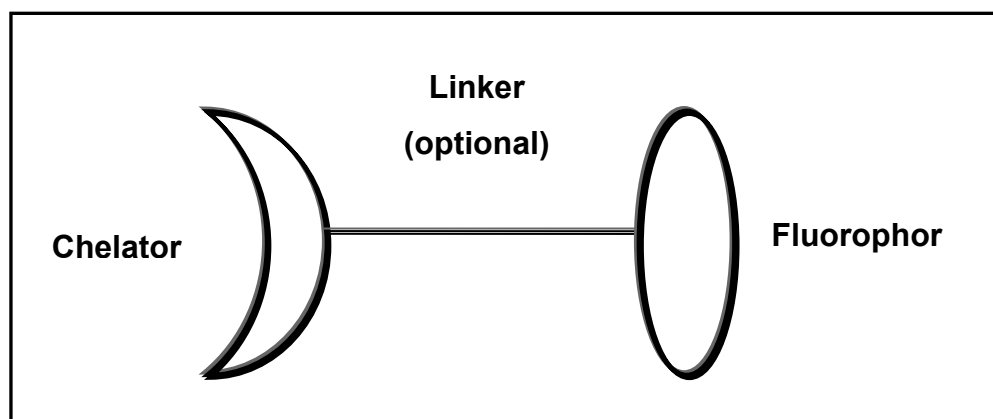


Abbildung 24 : Schematischer Aufbau einer Fluoreszenzsonde

Die Chelatereinheit besteht je nach gewünschtem Erfassungsgrad aus den Eisen(II)-selektiven Chelatoren 1,10-Phenanthrolin, 2,2'-Dipyridyl oder N,N-Bis(pyridin-2-yl-methyl)amin. Die beiden erstgenannten Chelatoren bilden mit  $\text{Fe}^{2+}$  3:1 Chelator/Fe(II)-Komplexe aus, während der letztgenannte Chelator 2:1 Komplexe mit Fe(II) bildet.

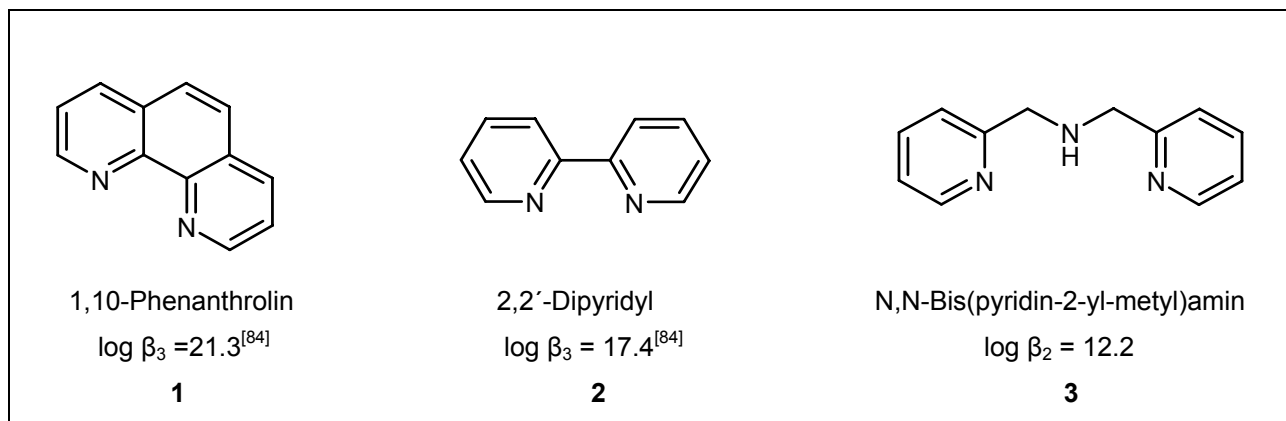


Abbildung 25: Verwendete Chelatoren in den Fluoreszenzsonden

Mit Hilfe dieser Chelatoren sollte es möglich sein, ausschließlich den sogenannten chelatisierbaren Eisenpool zu erfassen und nicht das in Funktions- oder Speicherprotein eingebauten Eisen, da die entsprechenden Komplexbildungskonstanten der niedermolekularen Liganden niedriger und die der Funktionsproteine wesentlich höher sind. Die bereits entwickelten Sonden für den mitochondrialen Eisenpool, RPA (**4**) und RDA (**5**) haben folgende Struktur:

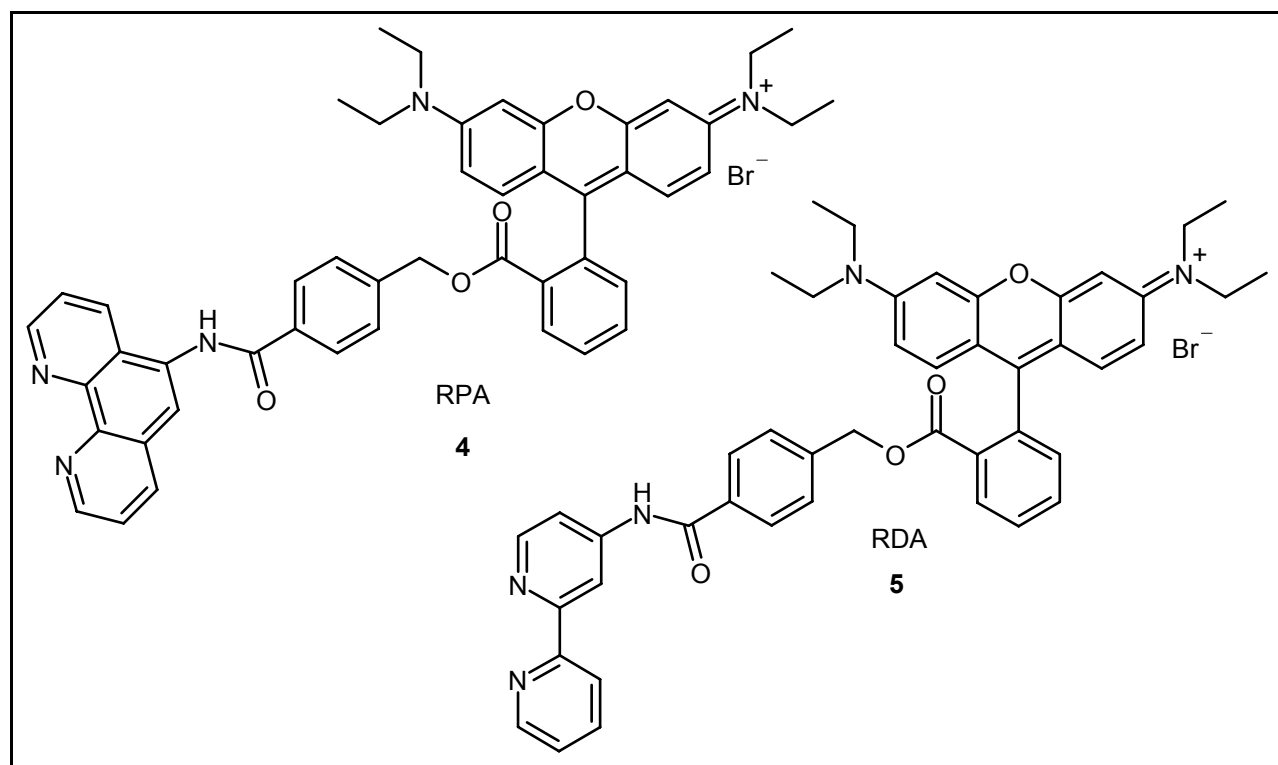


Abbildung 26 : Die Fluoreszenzsonden RPA und RDA

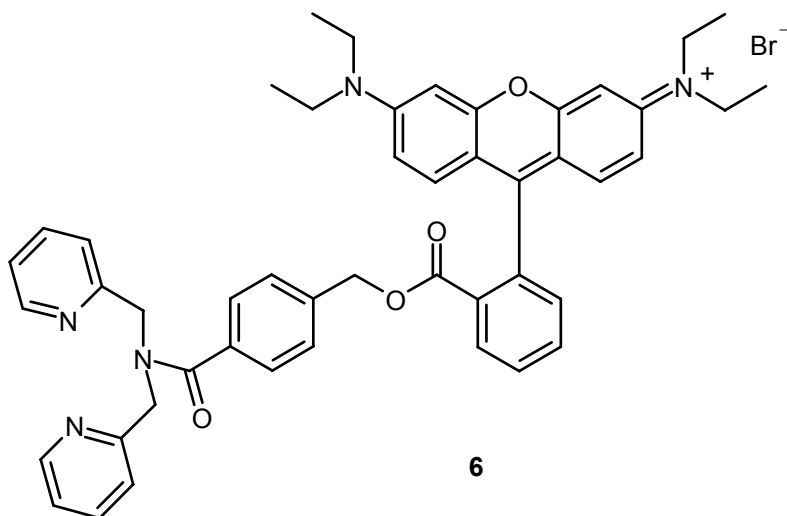
Die Sonden besitzen beide das Fluorophor Rhodamin B, welches durch seine positive, delokalisierte Ladung die Zielsteuerungskomponente für die Akkumulation in den Mitochondrien darstellt. Das fluorophore System und die beiden Chelatoren sind über den gleichen benzyllischen Spacer miteinander verknüpft worden

## 2 Problemstellung

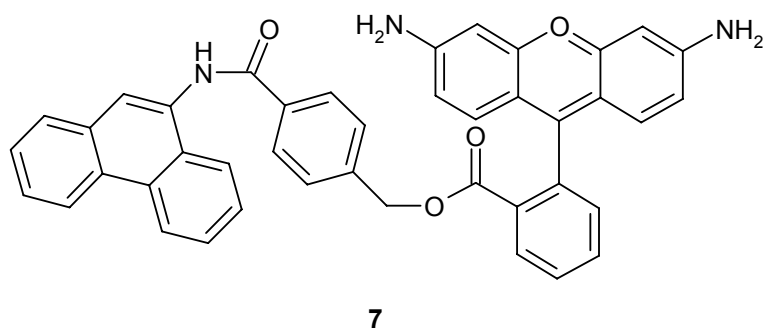
In vorhergehenden Arbeiten wurde der chelatisierbare Eisenpool in Mitochondrien mit Hilfe der Sonden RPA und RDA bereits erfolgreich quantifiziert. Die erhaltenen Daten zeigen, dass die Komplexbildungskonstante für die Bindung von Eisen an niedermolekulare physiologische Liganden unter  $\log \beta_3 = 17.4$  liegt.

Der Grund hierfür ist die Tatsache, dass mit der Sonde RDA, die den Chelator 2,2'-Dipyridyl trägt ( $\log \beta_3 = 17.4$ ), die gleiche Menge an chelatisierbarem Eisen ermittelt wurde wie mit RPA. Diese Sonde trägt 1, 10-Phenanthrolin als Chelatereinheit ( $\log \beta = 21.3$ ). Daher muß die globale Komplexbildungskonstante des im chelatisierbaren Eisenpool gebundenen Eisens unter der des RDAs liegen. Daher stellt die Kenntnis der Bindungsaffinitäten von Eisen an häufig und in höheren Konzentrationen vorkommende niedermolekulare physiologische Liganden einen weiteren wichtigen Schritt in der Charakterisierung des chelatisierbaren Eisenpools dar. Um dieses Ziel zu erreichen, muß ein Spektrum von Fluoreszenzsonden entwickelt werden, deren Chelator-Einheiten eine abgestufte Affinität zu  $\text{Fe}^{2+}$  besitzen. Damit kann durch ein Eingrenzungsverfahren („bracketing“) die Obergrenze der Bindungsaffinität im chelatisierbaren Eisenpool festgelegt werden.

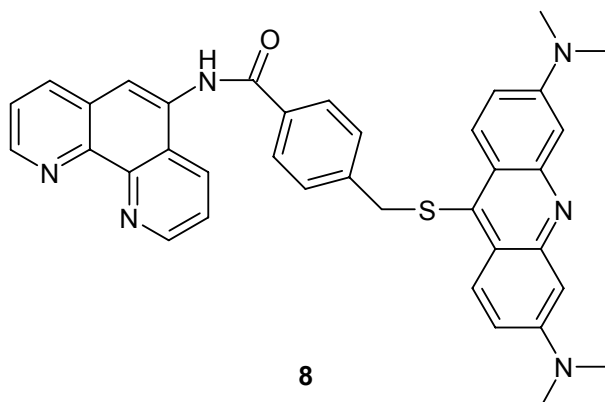
Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit sollte eine mitochondriale Fluoreszenzsonde mit dem Chelator N,N-Bis(pyridin-2-yl-methyl)amin versehen werden. Dieser Chelator besitzt eine Komplexbildungskonstante von  $\log \beta_2 = 12.2$  und liegt mit diesem Wert deutlich unterhalb der Konstanten der bereits vermessenen Sonden. Sofern mit dieser Sonde geringere  $\text{Fe}^{2+}$ -Konzentrationen als mit RDA gefunden würden, hieße das, daß die mittlere Bindungsaffinität im Eisenpool zwischen  $\log \beta_2 = 12.2$  und  $\log \beta_3 = 17.4$  liegt. Die Zielverbindung **13** sollte in Analogie zu den bereits entwickelten Sonden RPA und RDA, einen benzyllischen Spacer zwischen dem Fluorophor Rhodamin B und dem Chelator besitzen und dementsprechend wie folgt aufgebaut sein:



Um eventuelle Einflüsse wie pH-Wert, Temperatur oder Umgebung auf das Verhalten der Fluoreszenzsonden zu erkennen, sollte im zweiten Teil der Arbeit ein Referenzfarbstoff, die sogenannte „grüne Kontrolle“, synthetisiert werden, der einen ähnlichen strukturellen Aufbau, wie die verwendeten mitochondrialen Sonden besitzt. Die Chelatereinheit sollte durch 1,10-Phenanthren substituiert werden. Die Verbindung besitzt im Vergleich zum 1,10-Phenanthrolin im RPA zwar eine ähnliche Struktur, aber keine Fe-chelatisierende Eigenschaft. Die benzylische Spacereinheit konnte erhalten bleiben. An das Fluorophor wurde die Forderung gestellt, einen ähnlichen strukturellen Aufbau wie das Rhodamin B zu besitzen, aber in einem anderen Wellenlängenbereich zu fluoreszieren. Diese Bedingungen sollten durch die Verwendung von Rhodamin 110 erfüllt werden. Rhodamin 110 und Rhodamin B besitzen ähnliche Strukturen, durch unterschiedliche funktionelle Gruppen aber andere Fluoreszenzwellenlängen. Die angestrebte Struktur des Referenzfarbstoffes **7** ist nachstehend dargestellt.



Ein drittes Ziel dieser Arbeit bestand in der Reinigung und der zellulären Vermessung der in meiner Diplomarbeit dargestellten Fluoreszenzsonde „PHENAC“ **8**, die für die Erfassung des chelatisierbaren Eisenpools im Zellkern entwickelt wurde und folgende Struktur besitzt:

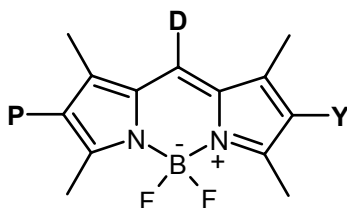


Erste Vorversuche ergaben, dass die Sonde in den „sauren“ Kompartimenten der Zelle akkumulierte, da die Dimethylaminofunktionen, des fluorophoren Systems, bei dem dort vorliegenden pH-Werten protoniert werden. Die Protonierung sorgt für eine lokalisierte Ladung im Molekül, welche wiederum die Membrangängigkeit aufhebt. Da sich die Amino-Gruppen in direkter Konjugation mit dem fluorophoren System befinden, ist die Fluoreszenz der Sonde jedoch pH-sensitiv und der Farbstoff damit zur Quantifizierung des Eisenpools nicht geeignet.

Der chelatisierbare Eisenpool in den sauren Kompartimenten der Zelle ist bis zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht eindeutig nachgewiesen und quantifiziert worden. Im vierten Hauptteil dieser Arbeit sollte das erfolgreiche Prinzip der Fluoreszenzsonden zur Quantifizierung dieses Pools daher auch auf Lysosomen angewendet werden. Dass Aminogruppen als Zielsteuerung für Lysosomen geeignet sind, war bereits aus Vorversuchen mit der Fluoreszenzsonde Phenac (**8**) bekannt. Die neu zu entwickelnde Sonde sollte diese funktionelle „Gruppe“ ebenfalls besitzen, die aber nicht in Konjugation zum fluorophoren System stehen darf. Das Fluorophor muss gerade für Anwendung in Zellen, aufgrund der pH-Unterschiede zwischen den verschiedenen Kompartimenten eine pH-insensitive Fluoreszenz besitzen. Die Chelatereinheit sollte

entweder aus einer 2,2'-Dipyridyl-Einheit oder aus einer 1,10-Phenanthrolin-Einheit bestehen, da beide Chelatoren bereits in Sonden erfolgreich getestet wurden. Nach einer umfassenden Literaturrecherche wurde als Fluorophor ein „BODIPY-Derivat“ ausgewählt, dessen Grundkörper ein 4,4-Difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen (BODIPY)-Gerüst ist

Diese Fluorophore zeichnen sich je nach Aufbau durch eine hohen Fluoreszenzquantenausbeute, eine pH-insensitive Fluoreszenz und eine leichte Derivatisierung z.B. in **Y** Position aus. Die Anbindung eines Chelators **D** sollte ebenfalls synthetisch möglich sein. BODIPY Derivate besitzen folgenden Aufbau:



Mit Hilfe dieser neuen Art von Fluoreszenzsonden sollte es möglich sein, nach dem Prinzip der Fluoreszenzlöschung den chelatisierbaren Eisenpool in Lysosomen und Endosomen zu quantifizieren.

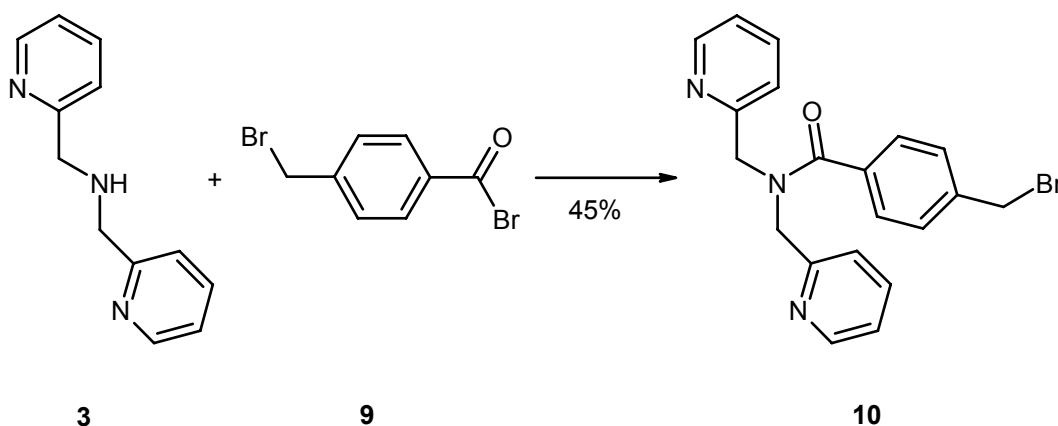
### 3 Darstellung der Fluoreszenzindikatoren

#### 3.1 Darstellung einer mitochondrialen Fluoreszenzsonde

##### 3.1.1 Darstellung von Rhodamin B-4-[bis(pyridin-2-yl-methyl)aminocarbonyl]benzylester (6)<sup>[85]</sup>

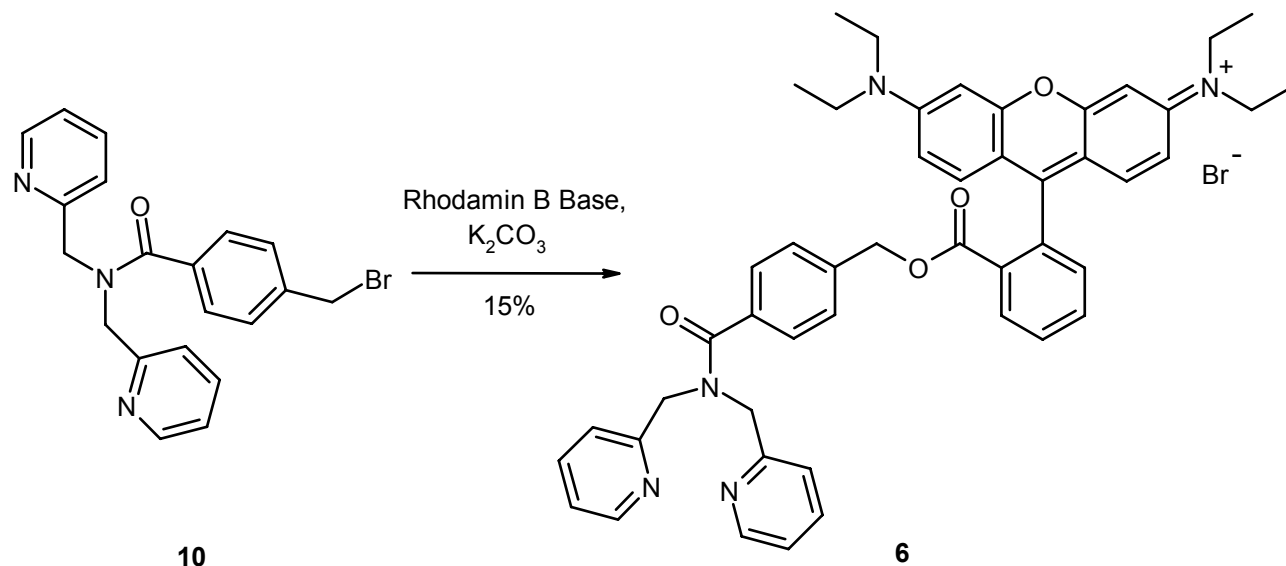
Der zu entwickelnde Fluoreszenzindikator sollte die schon beschriebenen Bauteile enthalten. Zunächst wurde die chelatisierende Komponente, Dipicolylamin, mit einem benzylichen Spacer versehen, um dann mit dem Fluorophor Rhodamin B Base zur Fluoreszenzsonde gekoppelt zu werden.

Das käufliche N,N-Bis(pyridin-2-yl-methyl)amin (**3**) wurde mit 4-Brommethyl-benzoyl-bromid (**9**) zur Reaktion gebracht, um den Chelator mit dem Spacermodul über eine stabile Amidbindung zu verknüpfen. Die Reinigung mittels Umkristallisation in Ethanol lieferte einen weißen Feststoff in einer Ausbeute von 45%.



Im nächsten Schritt wurde Verbindung **10** mit Rhodamin B Base unter Zusatz einer Base zur Reaktion gebracht.

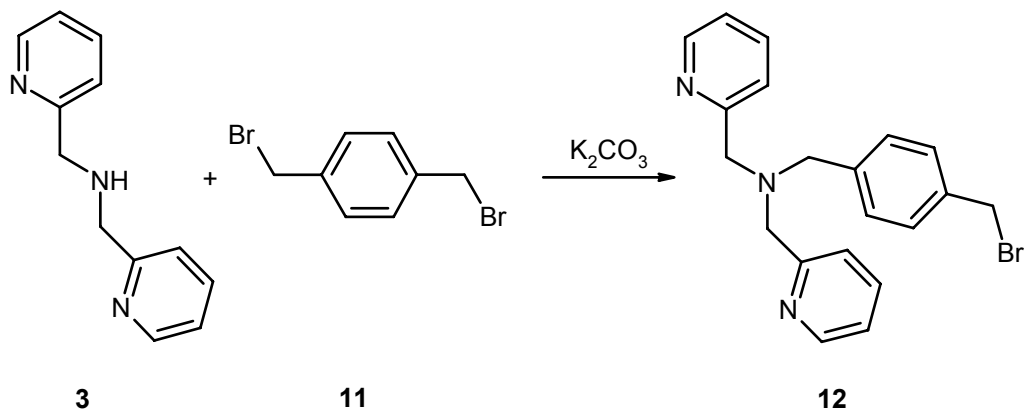




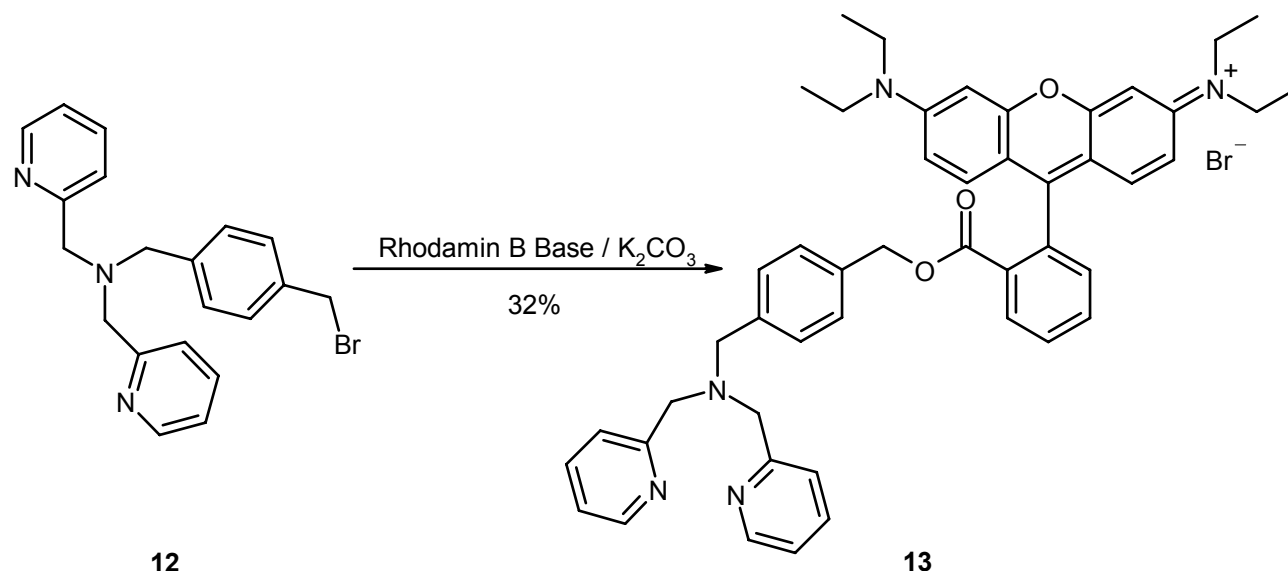
Die Reinigung von Verbindung **6** erfolgte säulenchromatographisch. Da diese drei mal durchgeführt werden musste, um eine ausreichende Reinheit der Verbindung zu gewährleisten, sank die Endausbeute auf 15%. Verbindung **6** wurde mittels NMR und ESI-TOF charakterisiert.

### 3.1.2 Darstellung von Rhodamin B-[bis(pyridin-2-yl-methyl)aminobenzylester (**12**)

Alternativ zu Verbindung **6** wurde eine Fluoreszenzsonde entwickelt, bei der die chelatisierende Einheit nicht über eine Amidbindung sondern über eine Aminverknüpfung an den Spacer gebunden ist. Dazu wurde N,N-Bis(pyridin-2-yl-methyl)amin (**3**) mit  $\alpha,\alpha'$ -Dibrom-p-xylol (**11**) und Kaliumcarbonat umgesetzt.



Verbindung **12** konnte nicht isoliert werden, da bei Entfernung des Lösungsmittels Zersetzung eintrat. Aus diesem Grund wurde auf Isolierung und Reinigung verzichtet und das Rohprodukt direkt mit Rhodamin B Base umgesetzt.



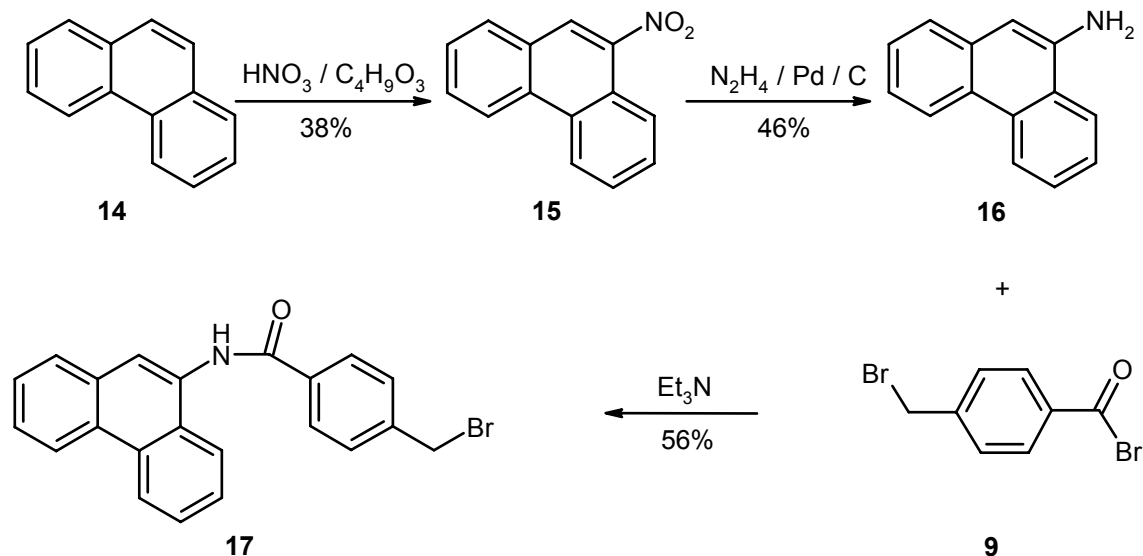
Die Reinigung erfolgte mittels Säulenchromatographie. Die Verbindung **13** fiel in einer Ausbeute von 32% an und wurde durch NMR-Spektroskopie und massenspektroskopische Daten eindeutig charakterisiert

### 3.1.3 Kontrollsubstanz für mitochondriale Fe-Bestimmung

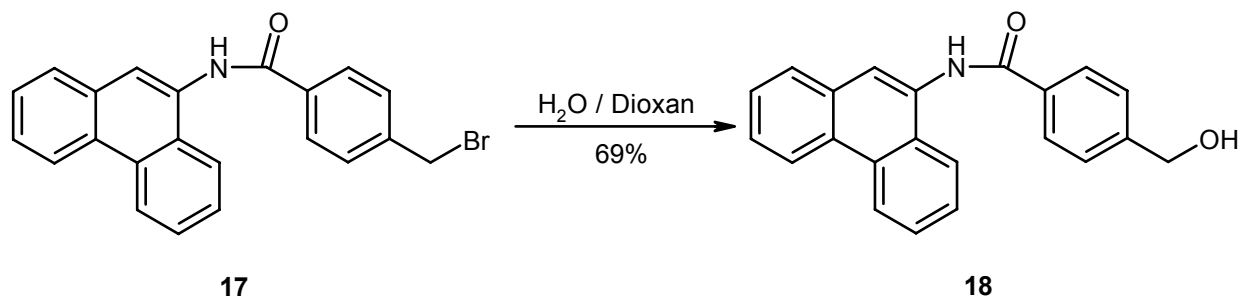
Um die eventuell vorhandenen Einflüsse der Fluoreszenzindikatoren RPA und RDA auf das mitochondriale System, wie Einflüsse der Sonde auf den pH-Wert oder die eventuelle Toxizität der Verbindungen, zu erkennen, sollte ein Fluoreszenzindikator entwickelt werden, der die gleichen Komponenten wie die erwähnten Sonden enthält (siehe Abschnitt 1.9). Allerdings sollte er keine Fe-chelatisierenden Eigenschaften besitzen, weswegen der Phenanthrolin-Rest durch Phenanthren ersetzt wurde. Dies gewährleistet eine vergleichbare Struktur, so daß sterische Effekte auszuschließen sind. Als Fluorophor sollte hierbei das Rhodamin 110 dienen, das strukturell fast mit Rhodamin B Base identisch ist, dessen Fluoreszenz aber in einem anderen Bereich als

die des Rhodamin B liegt. Es wäre weiterhin wünschenswert auch den Spacer ähnlich zu dem des RPA enthaltenen benzylichen Systems zu gestalten.

Um das gestellte Ziel zu erreichen wurde Phenanthren (**14**) mittels Essigsäureanhydrid und Salpetersäure nitriert. Diese Reaktion lieferte fünf Mononitrophenanthren-Isomere. Das gewünschte Isomer (**15**) konnte mittels Säulenchromatographie und Umkristallisation in einer Ausbeute von 38% gewonnen werden. Die Reduktion zum 9-Phenanthryl-amin (**16**) fand unter Zusatz von Hydrazin-Monohydrat und Palladiumkatalyse in einer Ausbeute von 46% statt<sup>[86]</sup>. Die weitere Umsetzung des Amins mit 4-Brommethyl-benzoylbromid (**10**) lieferte das gewünschte Chelator-Spacer System 4-(Brommethyl)-N-9-phenanthryl-benzamid (**17**) in einer Ausbeute von 56%.

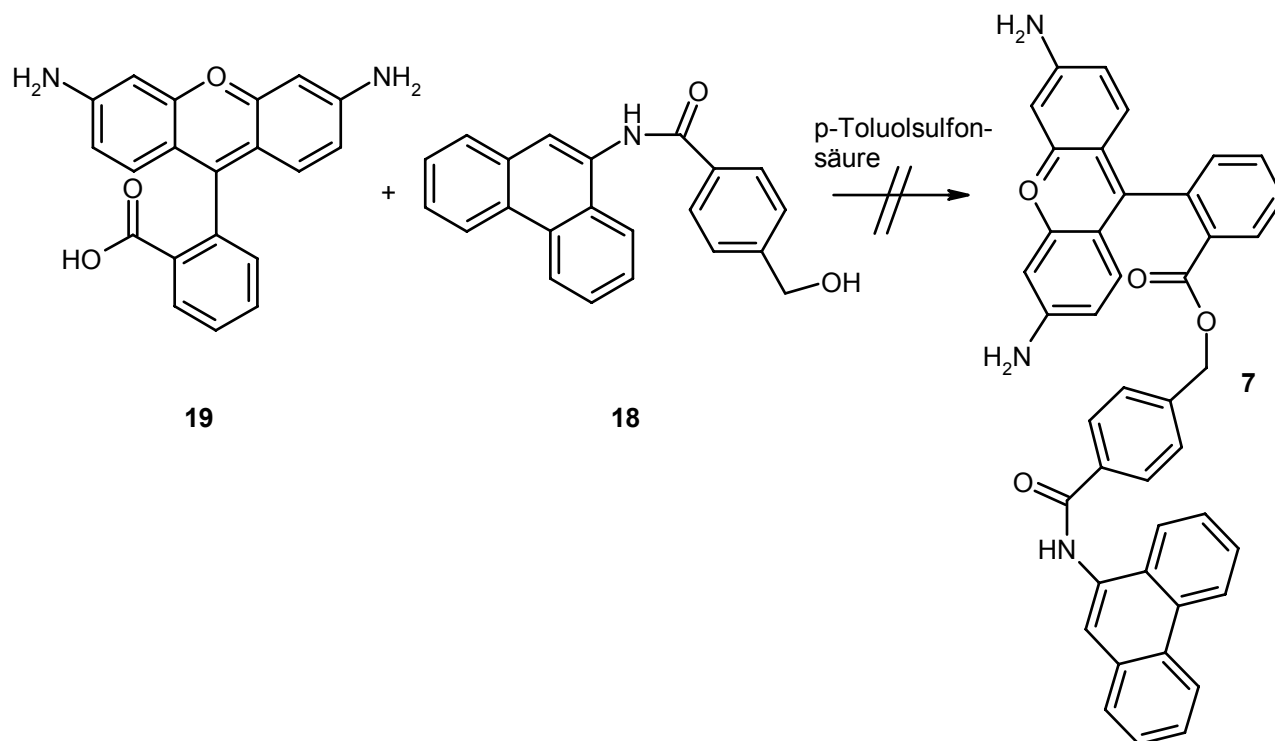


Das Phenanthren-Spacer System wurde durch Umsetzung mit Wasser in Dioxan in den entsprechenden Alkohol **18**, mit einem Umsatz von 69%, überführt.

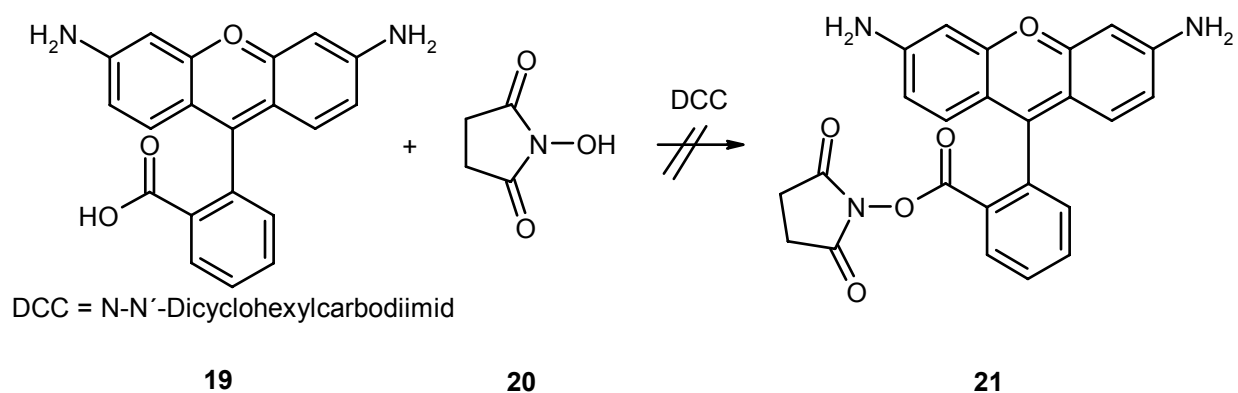


Zur Veresterung, wurde im folgenden Versuch p-Toluolsulfonsäure in katalytischen Mengen zugesetzt. Um die Gleichgewichtsreaktion in Richtung der Produkte zu verlagern, wurde Molekularsieb zur Aufnahme des entstehenden Reaktionswassers zugegeben.

Die Umsetzung mit Rhodamin 110 (**19**) unter Zugabe von p-Toluolsulfonsäure als Katalysator führte zu keinem nachweisbaren Umsatz.



Daher sollte *N*-Hydroxysuccinimid an das Rhodamin 110 addiert werden, um einen aktivierten Ester zu gewinnen.

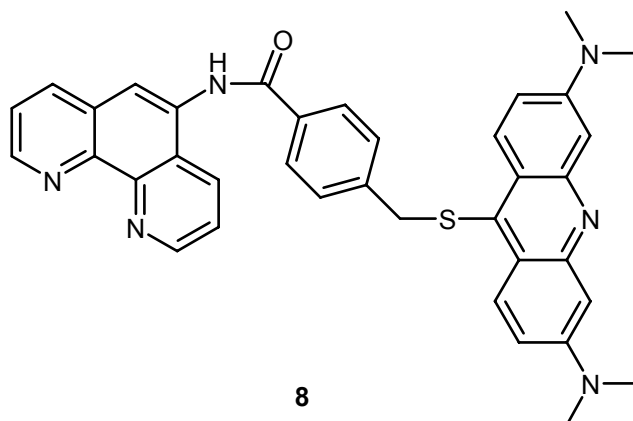


Auch hier kam es zu keiner Umsetzung.

4-Dimethylaminopyridin (DMAP) und Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) sind in der Literatur als Katalysatoren für Veresterungsreaktionen bekannt. Es wurde daher ein weiterer Versuch unternommen unter Einsatz dieser beiden Katalysatoren. Da auch dieser Darstellungsweg kein Produkt **7** lieferte, wurde der Syntheseversuch der „Grünen Kontrolle“ eingestellt.

### 3.2 Darstellung einer lysosomalen Fluoreszenzsonde

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit stand die Reinigung einer Fluoreszenzsonde **8** an, welche im Zellkern chelatisierbares Eisen quantifizieren sollte.



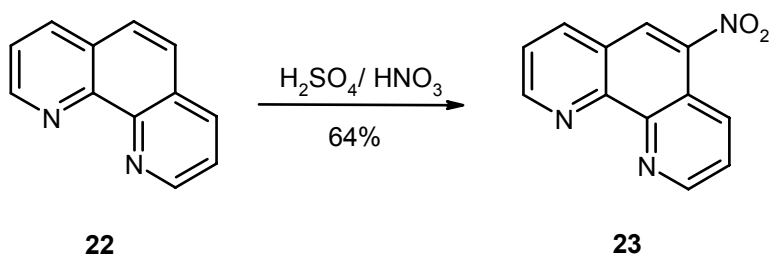
Die einzelnen Syntheseschritte wurden optimiert und das gewünschte Produkt gereinigt und zellulären Messungen unterworfen. Im Folgenden wird der systematische Aufbau der Sonde, bestehend aus dem Fluorophor Acridin-Orange und dem Chelator 1,10-Phenanthrolin geschildert. Wie bereits in der Diplomarbeit beschrieben, sollte aufgrund der vermuteten Interkalation in die DNA und dem damit verbundenen Energiegewinn eine Akkumulation der Sonde in den Zellkern stattfinden.

### 3.2.1 Darstellung von Phenac

1,10-Phenanthrolin sollte über einen Linker, in diesem Fall ein aromatisches Säurebromid, mit dem Fluorophor Acridin-Orange verbunden werden.

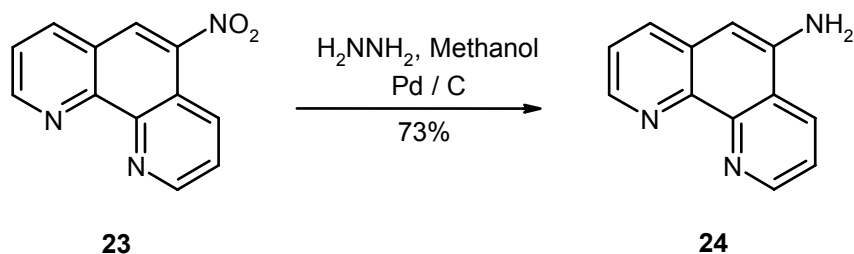
Das 1,10-Phenanthrolin musste eine funktionelle Gruppe tragen, welche mit dem Säurebromid eine Kopplungsreaktion eingehen konnte. Da sich Kopplungsreaktionen zwischen Aminen und Säurebromiden in der Praxis bewährt hatten, wurde eine Aminogruppe in den Chelator 1,10-Phenanthrolin eingeführt.

Das käufliche 1,10-Phenanthrolin (**22**) wurde mit Hilfe von Nitriersäure in 5-Nitro-1,10-phenanthrolin (**23**) überführt.<sup>[87]</sup>



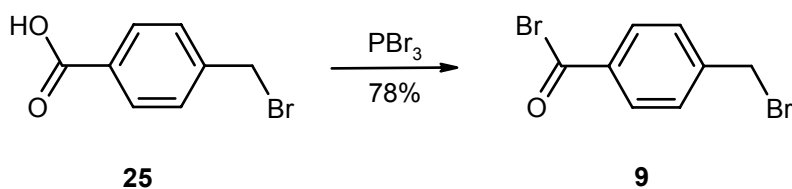
Die Ausbeute dieser Reaktion ließ sich auf 64% steigern, indem die Reaktionstemperatur nach Zugabe der Salpetersäure in die schwefelsaure Lösung des 1,10-Phenanthrolins für 1 Stunde auf 120°C erhöht wurde. Der Umsatz wurde mittels Dünnschichtchromatographie verfolgt.

Die Reduktion von 5-Nitrophenanthrolin (**23**) erfolgte durch eine Hydrierungsreaktion, in welcher Hydrazin-Monohydrat als Wasserstofflieferant diente. Hydrazin wurde aus zwei Gründen gewählt.<sup>[88]</sup> Zum einen fallen als Nebenprodukte der Reaktion nur Wasser und Stickstoff an, zum anderen kann die Vollständigkeit der Reaktion anhand der nachlassenden Gasentwicklung beobachtet werden. Die Umsetzung, mit einer Ausbeute von 73%, erfolgte in Methanol, als Katalysator wurde Palladium auf Aktivkohle verwendet.



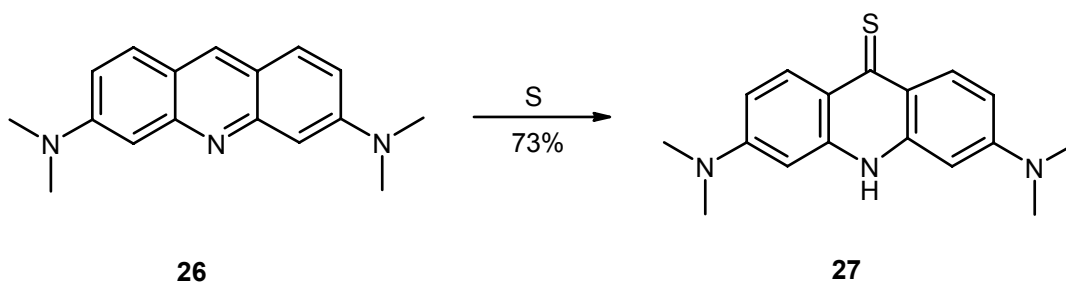
Der Grad der Umsetzung wurde mittels Dünnschichtchromatographie verfolgt.

4-Bromomethylbezoessäure (**25**) wurde mit Phosphortribromid, mit einer Ausbeute von 78%, zum Säurebromid (**9**) umgesetzt.<sup>[89]</sup>



Da das gebildete Säurebromid (**9**) sehr schnell mit Luftfeuchtigkeit zur Säure hydrolysiert, wurde die Reaktion unter trockenem Schutzgas durchgeführt. Andere Halogenierungsmittel wie  $\text{SOCl}_2$  kamen hier nicht in Frage, da eine Substitution des Bromids als Nebenreaktion auftreten kann.

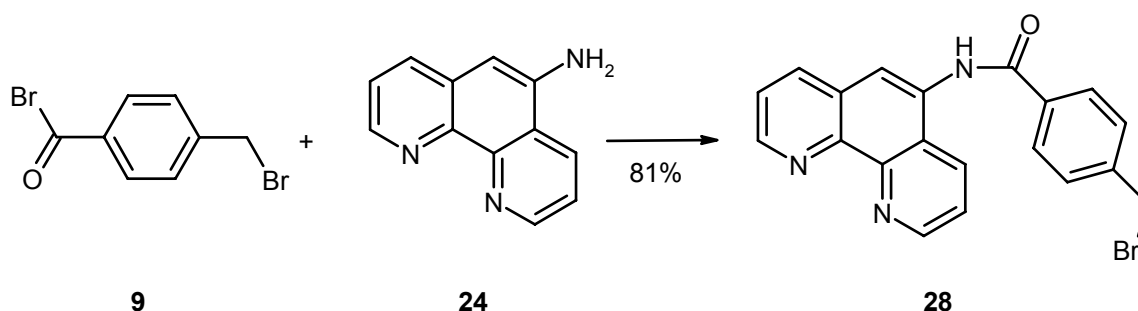
Die Umsetzung von Acridin-Orange (**26**) mit Schwefel führte zu einer Einführung einer Thiongruppe in 9-Stellung **27**.<sup>[90]</sup>



Die in der Literatur beschriebene Reaktion wurde in der Weise geändert, dass die Edukte zunächst gemischt und gemörstert wurden, bevor sie auf  $205^\circ\text{C}$  erhitzt wurden. Nicht umgesetztes Edukt wurde durch fraktionierte Kristallisation aus dem

Reaktionsgemisch entfernt. Man erhielt das gewünschte Produkt in 73% Ausbeute. Es wurden verschiedene Lösungsmittel zur Umkristallisation getestet. Eine Reinheit wie in der Literatur beschrieben konnte jedoch nicht erreicht werden.

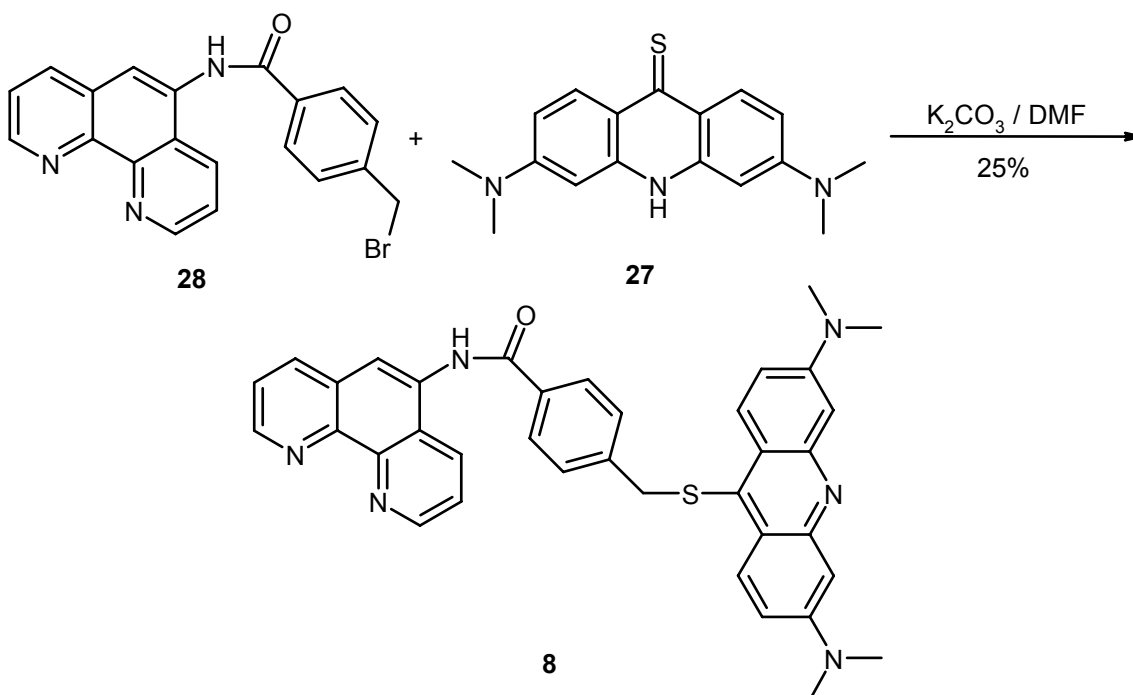
Die Umsetzung von Verbindung **9** mit Verbindung **24** zum Amid **28** erfolgte bei Raumtemperatur. Der Zusatz von Base war in diesem Fall nicht notwendig, da das Produkt selbst den gebildeten Bromwasserstoff abfängt und dadurch als Hydrobromid ausfällt. Durch eine basische Aufarbeitung wurde das Produkt **28** in 81%iger Ausbeute erhalten



Da dass das Produkt **28** lichtempfindlich ist, musste es unter Lichtausschluss aufbewahrt werden.

Im Anschluß wurde **28** mit dem Thion **27** zur Reaktion gebracht. Zum Abfang des entstehenden HBr diente in diesem Fall die zugesetzte Base K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.





Als Lösungsmittel kam nur Dimethylformamid in Frage, da sich Verbindung **28** in den meisten Lösungsmitteln als unlöslich erwies. Die Umsatzkontrolle erfolgte mittels Dünnschichtchromatographie. Da Acridin-Orange stark fluoresziert, konnte der Umsatz der Reaktion auf diesem Wege sehr gut verfolgt werden. Von der Verwendung von Kieselgelplatten ist dabei abzuraten, da eine Zersetzung des Acridin-Orange beobachtet werden konnte. Das Produkt **8** konnte durch zweimalige Umkristallisation in Ethanol rein erhalten werden.

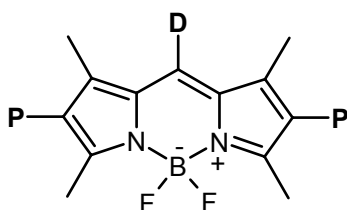
In den nachfolgenden zellulären Messungen stellte sich jedoch heraus, dass die dargestellte Sonde nicht in den Zellkernen, sondern in den sauren Kompartimenten der Zelle, den Lysosomen und Endosomen, akkumuliert. Diese Anreicherung konnte damit erklärt werden, dass die Dimethylaminofunktionen am Fluorophor im sauren Milieu der Lysosomen und Endosomen protoniert werden und **8** somit als geladenes Molekül nicht mehr in das Cytosol transportiert werden kann.

Zudem stellte sich heraus, dass die Fluoreszenzintensität der Sonde mit zunehmenden pH-Wert sank. Diese Tatsache machte es daher unmöglich, quantitative Eisenbestimmungen durchzuführen. Bei der Entquechung der Sonde in den

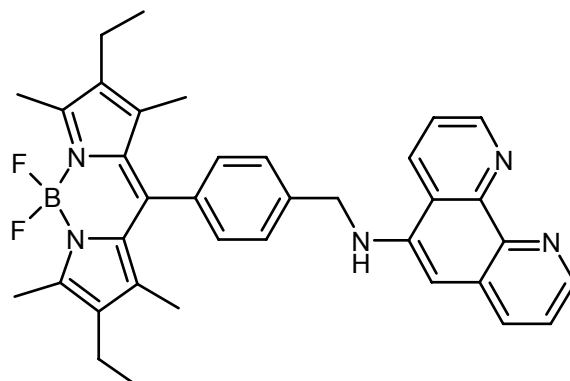
Lysosomen wurden diese alkalisiert, was zu einem Abfall der Fluoreszenzintensität führte. Da diese Abnahme jedoch von zwei Faktoren, zum einen der Entquenchung und zum anderen durch pH-Wert Erhöhung zustande kam, musste eine neue Sonde entwickelt werden, welche keine pH-Abhängigkeit besitzt. Die Ursache der pH-Abhängigkeit der Fluoreszenz ist dabei im Vorhandensein einer protonierbaren funktionellen Gruppe, welche in Konjugation zum fluorophoren System steht, zu suchen.

### 3.2.2 Darstellung BODIPYs

Durch eine umfassende Literaturrecherche wurde ein Fluorophor gefunden, welches die wichtigsten Bedingungen, für eine lysosomale Anwendung, wie pH-Insensitivität und geeignetes Fluoreszenzverhalten besaß. Der Grundkörper ist ein 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen (BODIPY)-Gerüst.

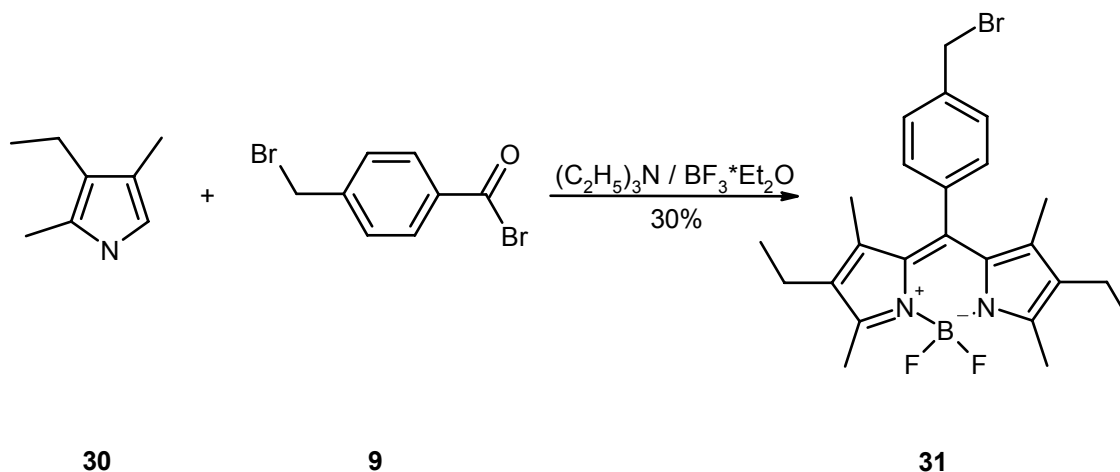


Diese Verbindungen finden mittlerweile eine breite Anwendung in der Entwicklung spezifischer Fluoreszenzsonden.<sup>[91-105]</sup> In der Literatur werden die BODIPYs aus der Reaktion eines Säurechlorids<sup>[106-108]</sup> **D** oder eines Aldehydderivates<sup>[109-111]</sup> mit einem substituierten Pyrrolderivat **P** beschrieben. Das erste BODIPY-Molekül, **29** sollte wie folgt aufgebaut sein:

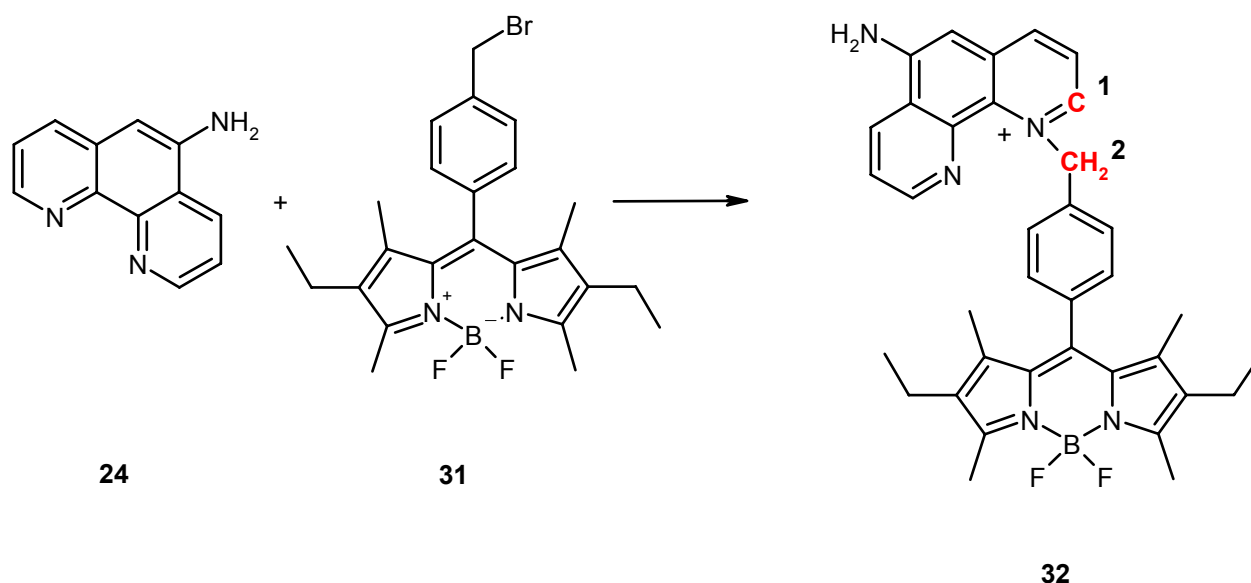


29

Das Fluorophor ist über einen Benzylamin-Spacer mit dem Chelator 1,10-Phenanthrolin verknüpft. Die sekundäre Aminofunktion sollte in den Lysosomen protonierbar sein und stellt damit die Zielsteuerung der Sonde dar. Im ersten Schritt wurde in bekannter Weise 4-Brommethylbenzoesäure in das Säurebromid überführt. Im Anschluß wurde dieses mit dem käuflichen 2-Ethyl-1,3-dimethylpyrrol (**30**) in einer Ausbeute von 30%, zu 8-(4-Brommethylphenyl)-4,4'-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-2,6-dimethyl-4-bor-3a,4a-diaza-s-indacen (**31**) umgesetzt.



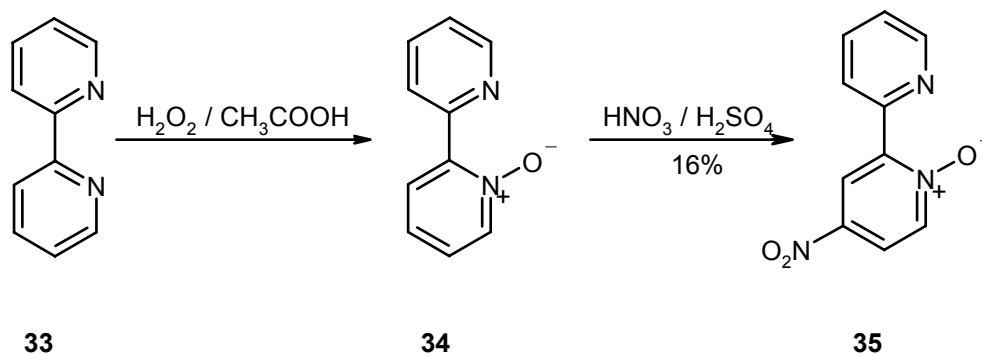
Verbindung **31** sollte mit Aminophenanthrolin zum gewünschten Produkt **32** gekuppelt werden. Dazu wurde das Bromid **31** mit 5-Amino-1,10-phenanthrolin (**24**) in Acetonitril umgesetzt. Das nach basischer Aufarbeitung erhaltene Rohprodukt wurde chromatographisch gereinigt. Die Auswertung der NMR-Spektren lieferte jedoch nicht **29** sondern die Produktstruktur **32** „**BODIPY 1**“.



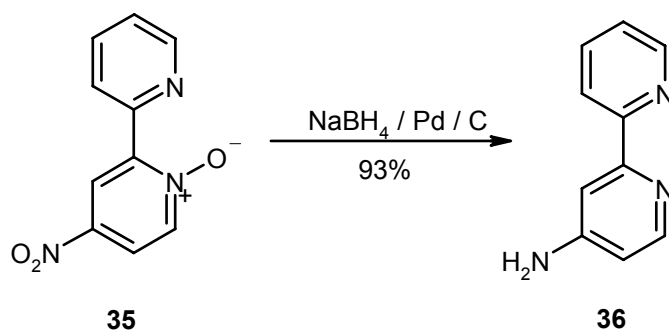
In den HMBC-Korrelationsspektren konnte man eindeutig eine Korrelation zwischen dem **C-1** Kohlenstoff des Phenanthrolingerüsts und den Protonen **H-2** der Methylengruppe erkennen. Diese Korrelation ist nur in der dargestellten Struktur möglich.

Um eine Substitution der primären Aminofunktion von Aminophenanthrolin zu erreichen, wurden weitere Versuche unternommen. Zunächst wurde Aminophenanthrolin mit Lithiumdiisopropylamid (LDA) deprotoniert, um so mit dem Bromid **31** unsetzen zu können. Auch bei Variation der Reaktionsbedingungen konnte mit dieser Methode kein Umsatz zum gewünschten Produkt erreicht werden.

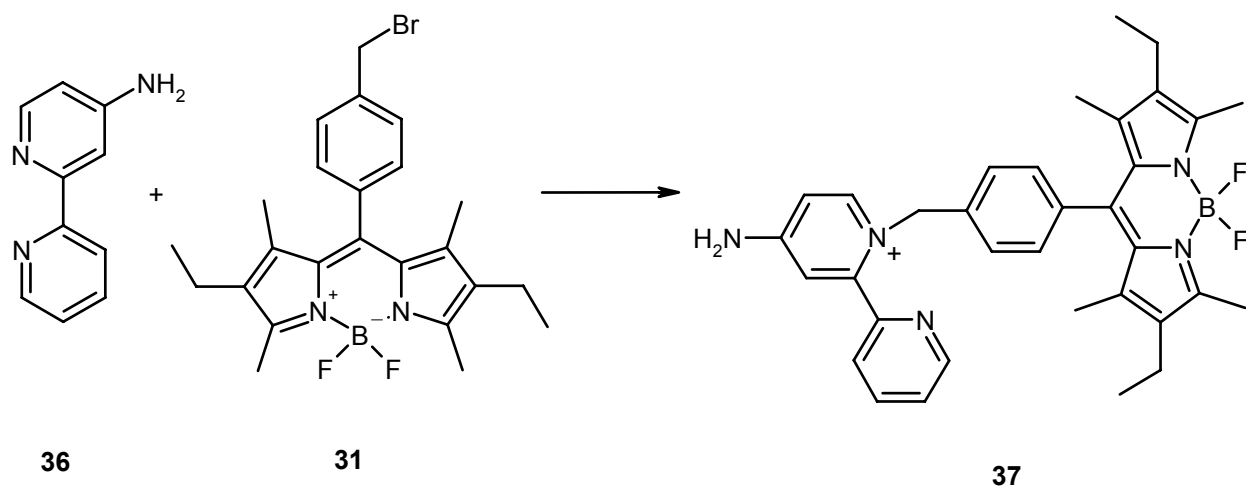
Alternativ wurde das Bromid **31** mit einem entsprechenden Dipyridyl-Derivat umgesetzt. Um dieses Derivat darzustellen, mußte 2,2'-Dipyridyl (**33**) zunächst am Stickstoffatom oxidiert werden, um eine Nitrogruppe einführen zu können.<sup>[112]</sup>



Nach der Oxidation mittels Wasserstoffperoxid wurde das Rohprodukt **34** nicht weiter gereinigt, sondern direkt mit Nitriersäure zu 4-Nitro-2,2'-bipyridin-1-oxid (**35**) umgesetzt. Die Umkristallisation lieferte Verbindung **35** in Form eines hellbeigen Feststoffes. Dieser wurde mittels Natriumborhydrid und katalytischen Mengen Pd/C (10%) zum 2,2'-Bipyridin-4-amin (**36**) umgesetzt.<sup>[112]</sup>

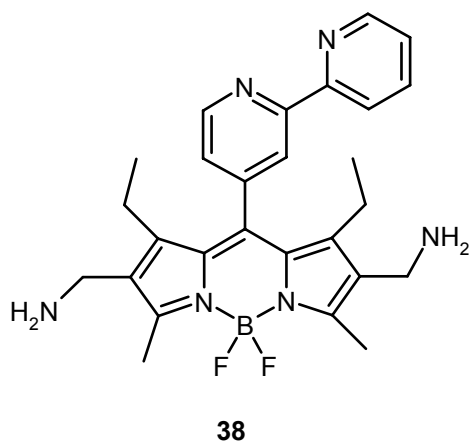


Die nachfolgende Umsetzung von 2,2'-Bipyridin-4-amin (**36**) mit dem Bromid (**31**) lieferte ebenfalls das am Ringstickstoff substituierte Produkt **37**, „**BODIPY 2**“.



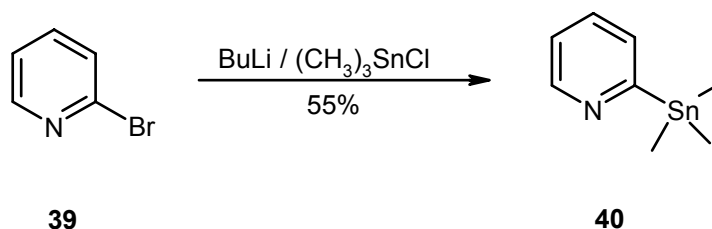
Das Produkt konnte mit Hilfe von HMBC-Korrelationsspektren eindeutig charakterisiert werden.

Ein neues Aufbaukonzept wurde entworfen, bei dem der Chelator direkt am fluorophoren System gebunden ist und sich die Zielsteuerungskomponente an der eingesetzten Pyrrolverbindung befindet. Die Verbindung sollte folgendermaßen aufgebaut sein:

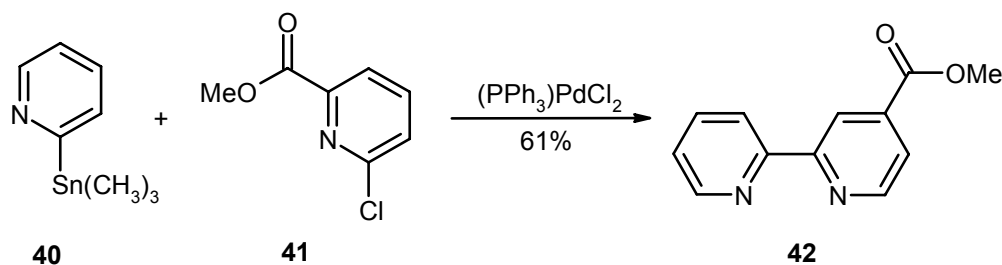


Um **38** zu erhalten, musste zunächst das entsprechende Säurechlorid des Bipyridyls dargestellt werden, um später mit einem Pyrrolderivat und Bortrifluoridiethyletherat zur gewünschten Sonde umzusetzen.

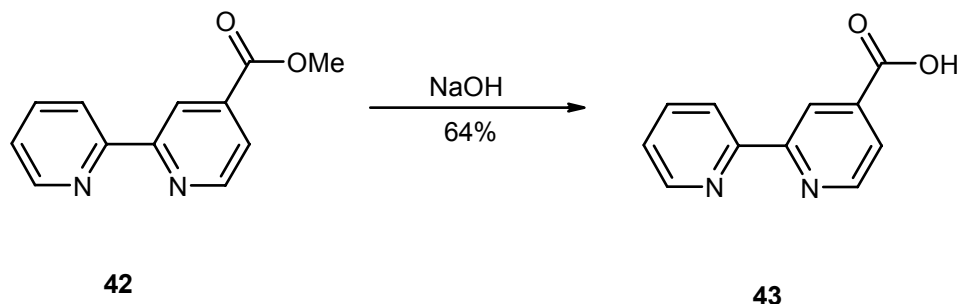
Im ersten Schritt wurde 2-Brompyridin (**39**) mit Butyllithium und Trimethylzinnchlorid zu 2-(Trimethylzinn)pyridin (**40**) umgesetzt<sup>[113]</sup>.



Im Anschluß fand eine Stille-Kupplung zwischen dem dargestellten 2-Trimethylstannylpyridin (**40**) und Methyl-6-chlornicotinat (**41**) statt.<sup>[114]</sup> Die Reaktion wurde mit  $(\text{PPh}_3)_2\text{PdCl}_2$  katalysiert und lieferte **42** in einer Ausbeute von 61%.



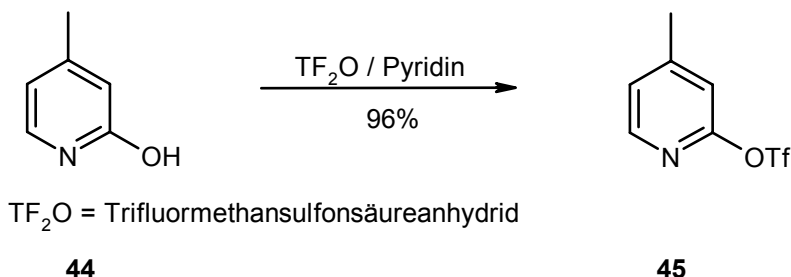
Danach wurde der Ester durch Reaktion mit  $\text{NaOH}$  in Wasser zur 2,2'-Bipyridyl-3-carbonsäure (**43**) verseift.



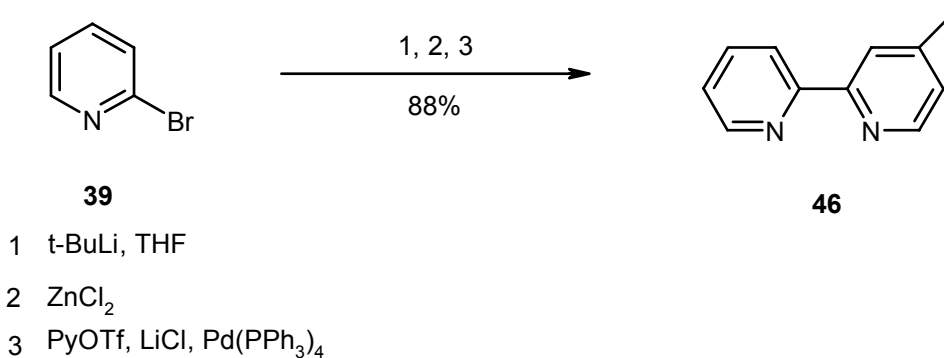
Nun sollte **43** in das Säurehalogenid überführt werden, dazu wurde die Säure (**43**) zum einen mit Thionylchlorid, zum anderen mit Phosphortribromid behandelt. Nach der

Reaktion und Aufarbeitung stellte sich jedoch heraus, dass das Reaktionsprodukt den gleichen Schmelzpunkt wie die eingesetzte Säure hatte.

Eine weitere literaturbekannte Darstellung für BODIPYs ist die Umsetzung eines Aldehydes mit einem Pyrrolderivat unter Verwendung von DDQ. Dazu war die Synthese von 4-Formyl-2,2-bipyridin erforderlich. Die Darstellung erfolgte über drei Syntheseschritte. Zunächst findet eine Aktivierung von 4-Methyl-2-hydroxypyridin (**44**) statt, indem die Verbindung in das reaktivere Triflat **45** mittels Veresterung überführt wird.<sup>[115]</sup>



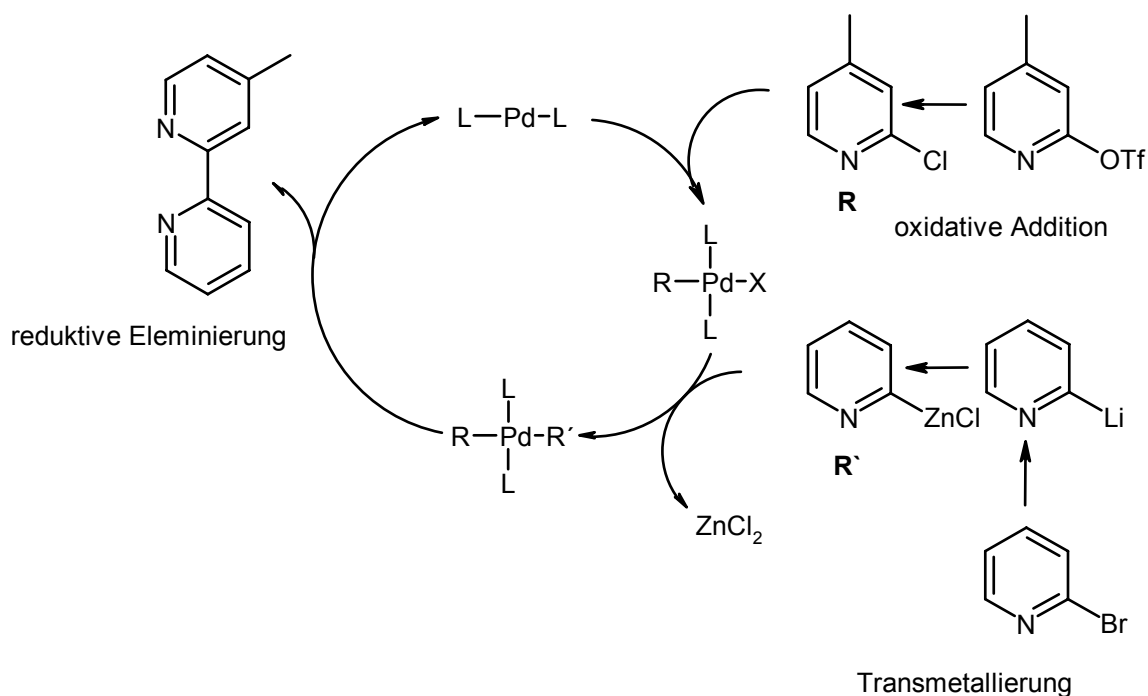
In der nachfolgenden Negishi Kreuzkupplung reagiert dieses mit 2-Brompyridin (**39**) zu 4-Methyl-2,2'-bipyridin (**46**).<sup>[115]</sup>



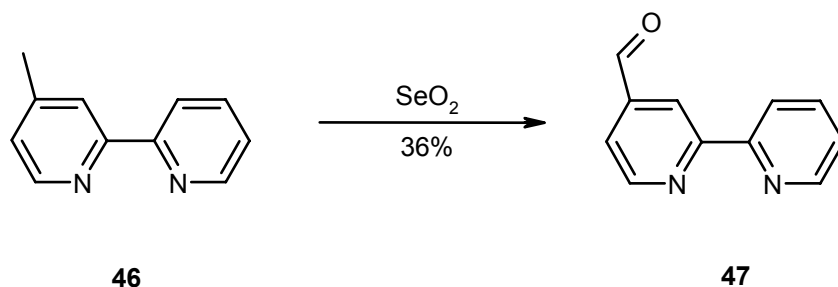
Im ersten Schritt wird Brompyridin mit Hilfe von Butyllithium in die entsprechende Lithiumverbindung überführt und dann weiter mit ZnCl<sub>2</sub> umgesetzt. Das Triflat wird unter Einwirkung von LiCl in die Chlorverbindung überführt, welche sich unter oxidativer Addition an den Palladium(O)-Komplex anlagert, in dem das Palladium nun in der



Oxidationsstufe +II vorliegt. In der nachfolgenden Transmetallierung wird Verbindung R' auf den Palladium(II)-Komplex übertragen. Die abschließende reduktive Eliminierung liefert das gewünschte Bipyridyl und den eingesetzten Katalysator Pd(O).



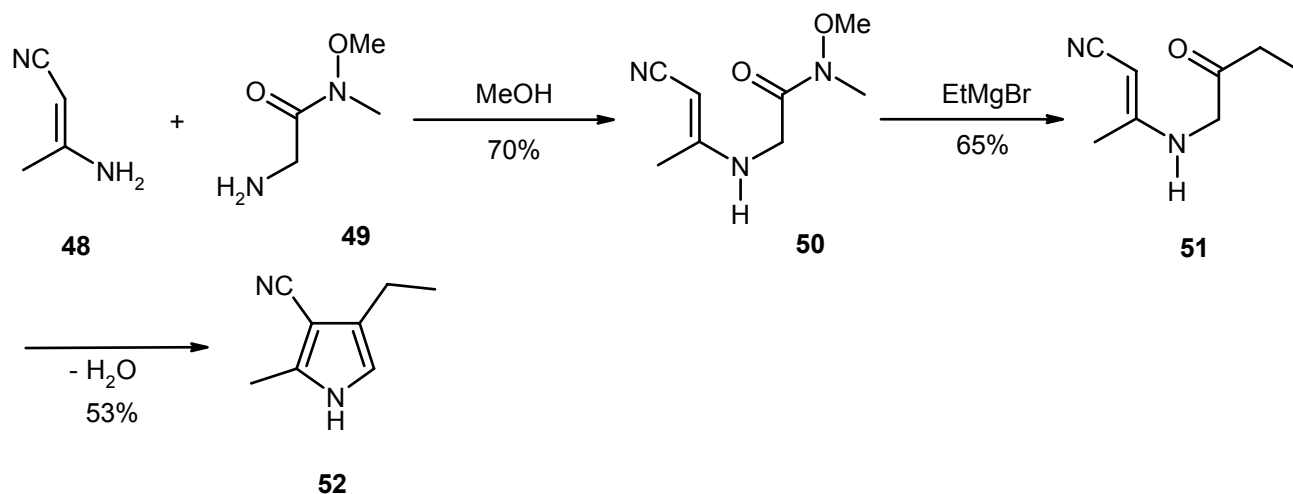
Die Oxidation mit Selendioxid führt zum gewünschten Aldehyd, 4-Formyl-2,2'-bipyridin (**47**).<sup>[116]</sup>



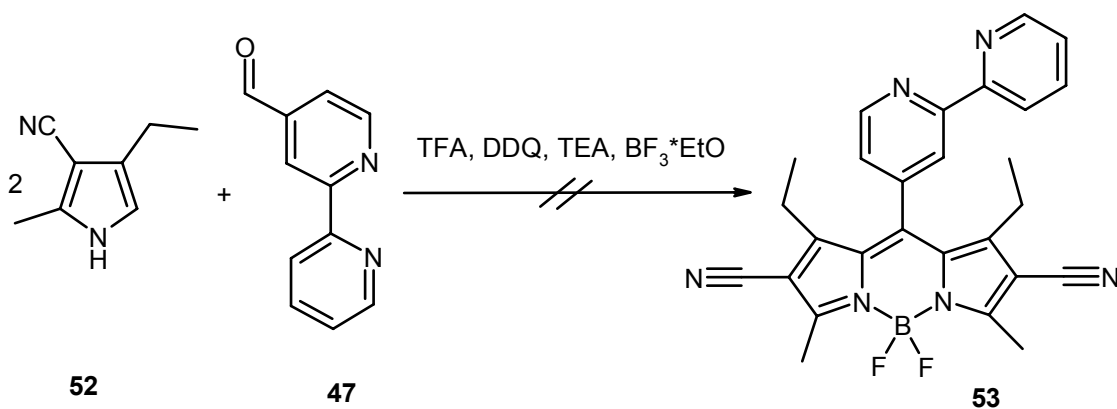
Die Zielsteuerungskomponente, welche am Pyrrolderivat untergebracht werden muß, sollte nicht in Konjugation zum fluorophoren System stehen. Um die Akkumulation in den Lysosomen zu gewährleisten, musste eine funktionelle Gruppe gewählt werden, welche im sauren pH-Milieu der Lysosomen und Endosomen protonierbar ist. Es wurde

ein Cyanopyrrolderivat dargestellt, welches dann zunächst mit dem Bipyridylaldehyd zum BODIPY **53** umgesetzt werden sollte. Anschließend sollte die Cyanofunktion reduziert werden, so dass eine primäre Aminogruppe als Zielsteuerungskomponente vorhanden ist.

Die nachfolgenden Reaktionen zeigen die drei literaturbekannten Stufen<sup>[117]</sup>, über die das Cyanopyrrol **52** erfolgreich dargestellt werden konnte.

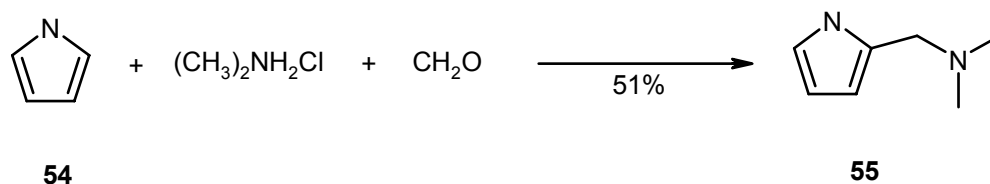


In der nächsten Stufe sollte das Cyanopyrrol mit dem Aldehyd des Bipyridyls zur Reaktion gebracht werden.



Die beiden Edukte konnten auch bei Variation der Reaktionsbedingungen nicht zur Reaktion gebracht werden. Der Grund hierfür ist wahrscheinlich im eingesetzten

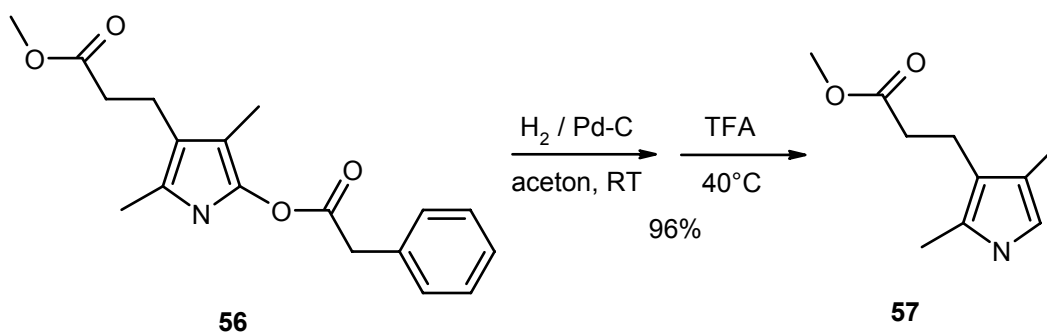
Pyrrolderivat, welches durch die Cyanogruppe deaktiviert wird. Aus diesem Grunde wurde ein anderes Pyrrolderivat synthetisiert, welches eine Dimethylaminogruppe trägt.



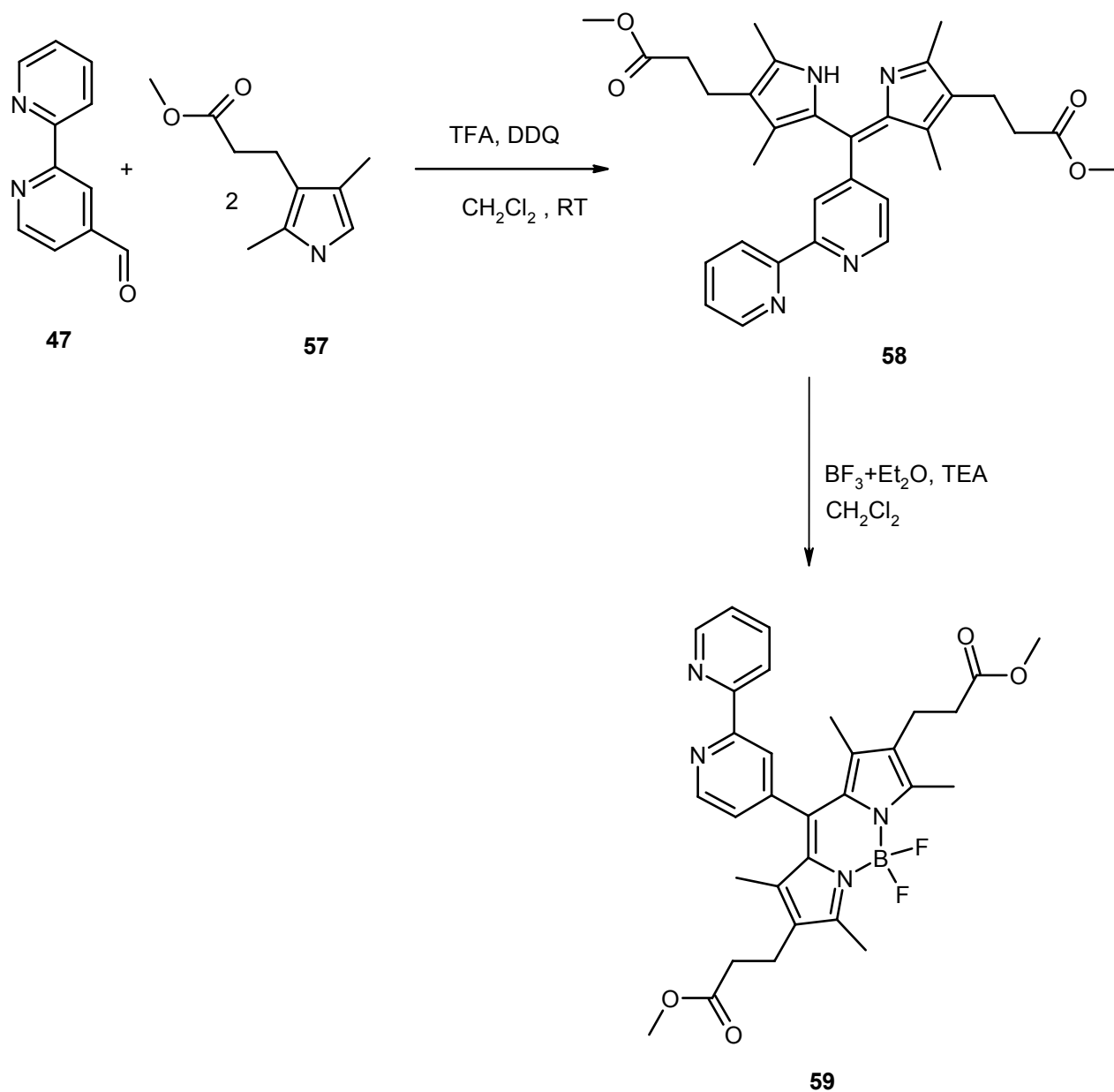
Nach erfolgreicher Synthese von 2-(Dimethylaminomethyl)pyrrol (**55**) wurde dieses in bekannter Weise mit dem Aldehyd **47** umgesetzt. Aber auch hier blieb die Reaktion zum gewünschten Produkt aus. Die Tatsache, dass alle erfolgreichen BODIPY-Synthesen mit Pyrrolderivaten beschrieben wurden, die bis auf die alpha Position voll substituiert sind, lässt darauf schließen, dass das Pyrrolderivat in 2,3,4-Stellung substituiert sein muß.

Aus diesem Grunde wurde ein Pyrrolderivat synthetisiert, welches an den Positionen 2, 3,4 substituiert ist und zusätzlich eine funktionelle Gruppe an einer Seitenkette trägt, die es ermöglicht die Zielsteuerung einzuführen. Dazu wurde **57** synthetisiert.

Das käufliche Methyl-5-(benzoylcarbonyl)-2,4-dimethyl-pyrrolpropionat (**56**) wurde zunächst mit Pd/C (10%) einer katalytischen Hydrierung unterworfen, dabei wird die Benzylgruppe als Toluol abgespalten. Die Decarboxylierung mittels Trifluoressigsäure lieferte das gewünschte Produkt 3-(2-Methoxycarbonyl)-2,4-dimethylpyrrol (**57**) in 96%iger Ausbeute.



Die Umsetzung des Pyrrolderivates **57** mit dem Aldehyd des Bipyridins **47** lieferte die Fluoreszenzsonde **59**, „**BODIPY 3**“, BPE genannt.

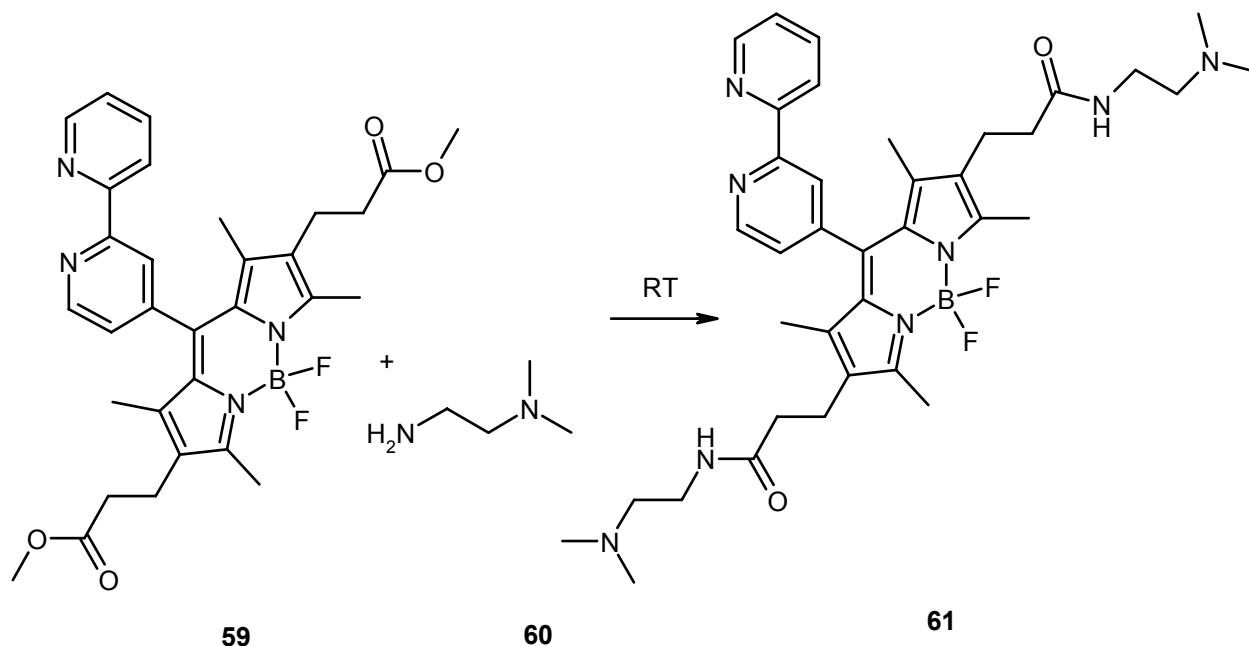


Im ersten Schritt der Reaktion findet eine Protonierung des Carbonylsauerstoffatoms der Formylgruppe mit Trifluoressigsäure statt. Das Pyrrolderivat besitzt aufgrund des aciden Wasserstoffes in  $\alpha$ -Position zum Stickstoff ein nucleophiles Zentrum, welches das Carbeniumion im 2,2'-Bipyridyl-4-carbaldehyd angreift. Durch Kondensation entsteht ein weiteres Carbeniumion, welches vom zweiten Pyrrolderivat angegriffen wird.

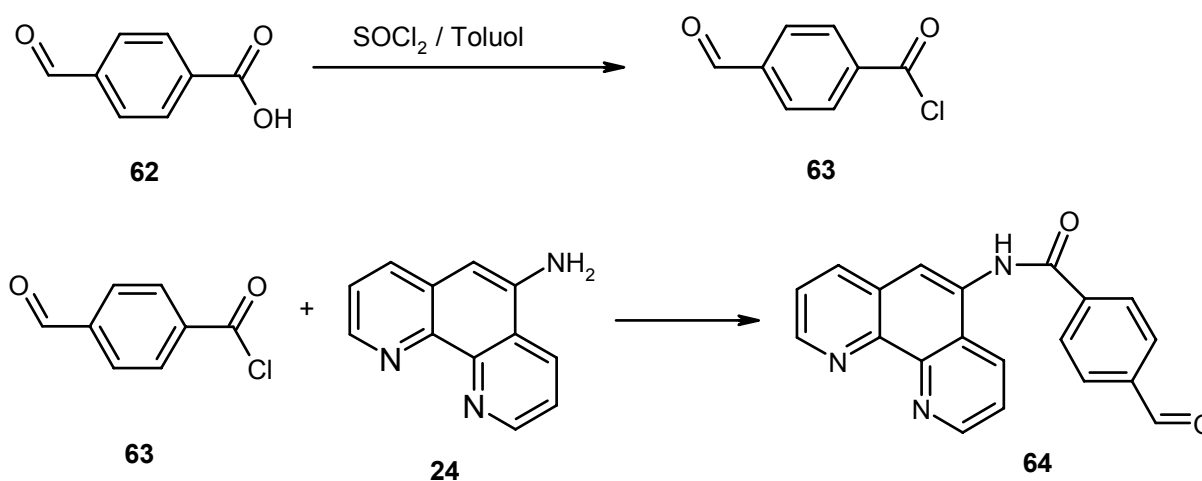
Nach erneuter Wasserabspaltung erfolgt die Oxidation mittels 2,3-Dichlor-5,6-p-Benzochinon (DDQ) zum Zwischenprodukt **58**. Der Reaktionsverlauf kann mit Hilfe der

Dünnschichtchromatographie verfolgt werden. Es erfolgte keine weitere Reinigung sondern ein direkter Umsatz mit Triethylamin und Bortrifluorid. Die Base Triethylamin deprotoniert dabei im ersten Reaktionsschritt den Stickstoff im gebildeten Zwischenprodukt **58**, dadurch wird ein Angriff der in der Reaktionslösung vorhandenen Lewis-Säure Bortrifluorid ermöglicht. Es kommt zur Bildung des gewünschten Produktes 2,6-bis-(propionsäuremethylester)-8-(2,2'-bipyridyl)-4,4'-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bor-3a,4a-diaza-s-indacen (**59**).

Nach Reinigung des Rohproduktes wurde dieses mit N,N'-Dimethyl-ethyldiamin umgesetzt, um die erforderliche Zielsteuerungskomponente in das Molekül einzuführen. Die Aminolyse von Estern ist möglich, verläuft aber in der Regel sehr langsam. Da in Verbindung **58** zwei Estergruppen vorhanden sind, sollte sich zunächst die Monoamid-Form bilden und später die Diamid-Form. Es wurde mit einem hohen Überschuss an Amin gearbeitet. Nach einigen Versuchen hinsichtlich der Eduktverhältnisse, der Temperatur und der Reaktionszeiten, stellte sich ein Überschuß von 30 Äquivalenten Amin, bei Raumtemperatur und einer Reaktionszeit von 4 Tagen als Optimum heraus. Bei diesen Bedingungen war kein Edukt mehr vorhanden und es zeigte sich keine Zersetzung der Produkte. Beide möglichen Produkte, also die Monoamid- und die Diamid-Form, waren im Produktgemisch enthalten. Die Isolierung der Produkte gelang durch säulenchromatographische Trennung.

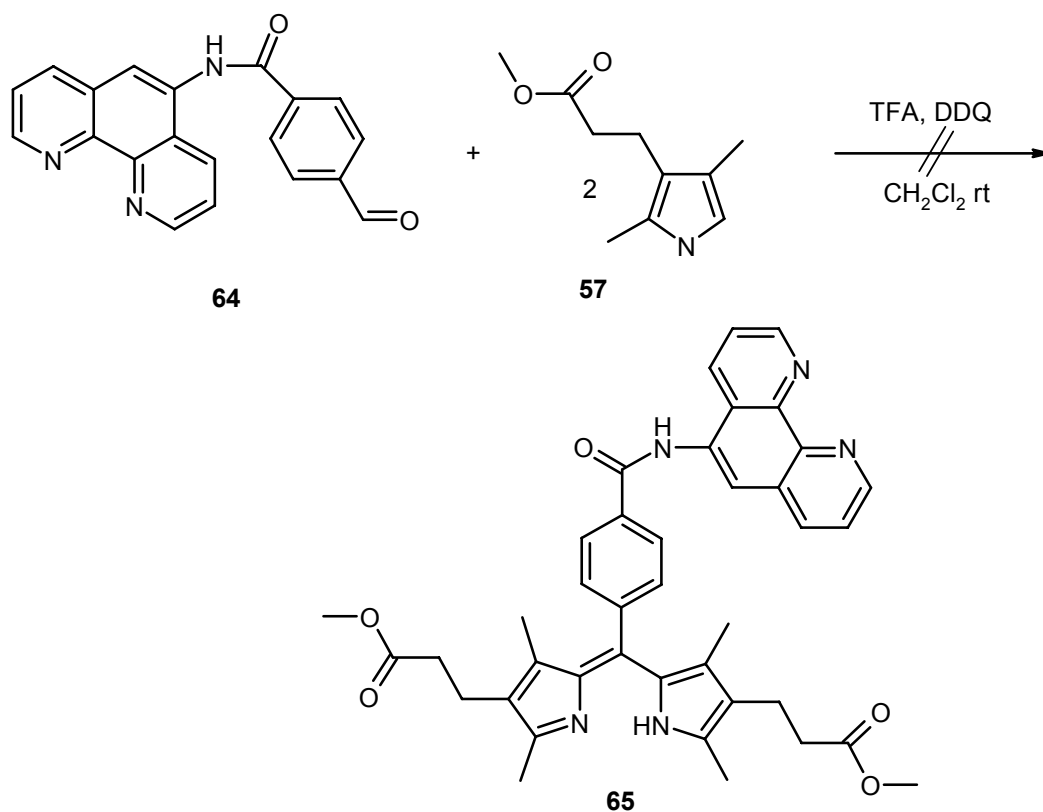


Nach erfolgreicher Synthese der Fluoreszenzsonde **61**, mit dem Chelator 2,2-Dipyridyl, wurde in Analogie zum mitochondrialen System, eine weitere Sonde konzipiert. Diese Sonde sollte 1,10-Phenanthrolin als Chelatoreinheit tragen, um eine höhere Komplexbildungskonstante von Sonde zu  $\text{Fe}^{2+}$  zu gewährleisten. Aus diesem Grund wurde ein Aldehydderivat der Phenanthrolineinheit dargestellt, welches über die Anbindung einer Spacereinheit an den Chelator, erreicht werden konnte.



Im ersten Schritt wurde 4-Carboxybenzaldehyd **62** mit Thionylchlorid zum 4-Formylbenzoylchlorid (**63**) umgesetzt. Das gewünschte Produkt 4-Formyl-N-(1,10)-phenanthrolin-5-benzamid (**64**) konnte durch die Umsetzung des Säurechlorides **63**, mit 5-Amino-1,10-phenanthrolin (**24**) erhalten werden.

Die nachfolgende Umsetzung des Aldehydes **64** mit dem entsprechenden Pyrrolderivat **57** wurde in Anlehnung an die erfolgreiche Synthese der Fluoreszenzsonde **59** unter vergleichbaren Bedingungen durchgeführt.



Die Verfolgung der Reaktion mittels Dünnschichtchromatographie zeigte jedoch keine Umsetzung. Die spektroskopische Auswertung des Rohproduktes zeigte, dass sich kein Produkt gebildet hatte und dass sich die Edukte zersetzt hatten.



## **4 Messungen im chemischen System**

Die Fluoreszenzsonden wurden zunächst auf ihre optischen Eigenschaften, wie Absorptionsverhalten und Fluoreszenz, hin untersucht. Da die Sonden zur Quantifizierung chelatisierbaren Eisens eingesetzt werden sollten, wurde die Reaktion auf Eisen, also die Löschung der Fluoreszenz, die Stöchiometrie der Komplexbildung mit Fe(II) im chemischen, wie auch im biologischen System getestet. Um auszuschließen, dass andere Einflüsse, wie im zellulären System vorhandene Kationen, pH-Wert-Änderungen, Ionenstärke etc., auf die Fluoreszenzeigenschaften der Sonden wirken, wurden diese Parameter ebenfalls untersucht.

### **4.1 Mitochondriale Fluoreszenzsonde**

Da die Fluoreszenzsonde PIRO als Fortführung der Arbeiten zu RPA und RDA dient, wurden die Messungen im chemischen und im zellulären System unter vergleichenden Bedingungen durchgeführt.

Zunächst wurde ein Absorptions- und Fluoreszenzspektrum aufgenommen, um die jeweiligen Maxima für die zellulären Messungen festzulegen. Die Spektren wurden in einem Tris / HCl-Puffer aufgenommen, welcher zuvor von Schwermetallionen befreit und mit 1M NaOH und 1M HCl auf einen mitochondrialen pH-Wert von 8.2 eingestellt wurde. Ein Zusatz von 0.18% Natriumdodecylsulfat (SDS) als Lösungsvermittler für die Sonde erfolgte erst kurz vor der Messung.

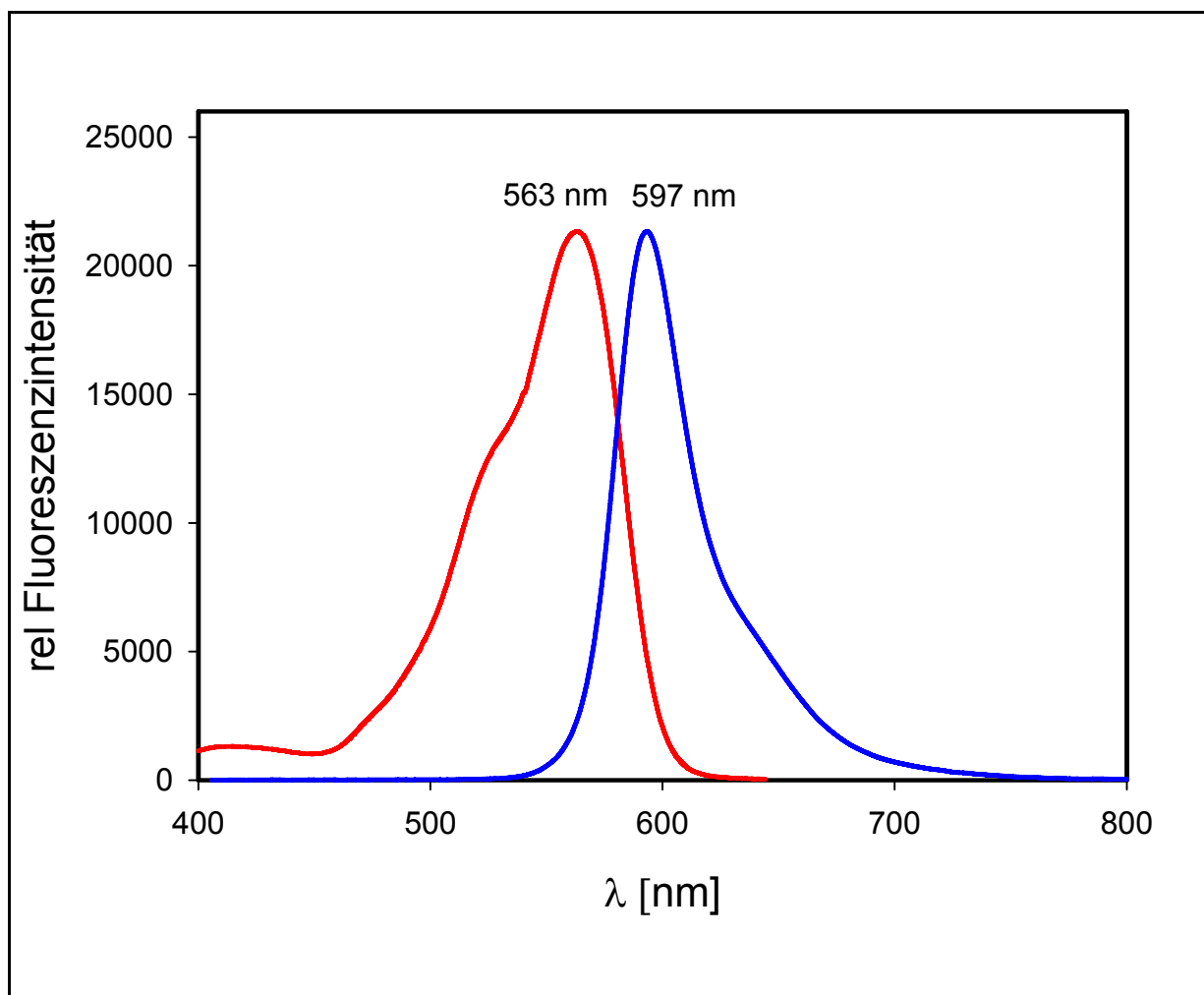


Abbildung 27: Anregungs- (—) und Emissionsspektrum (—) von Piro (10.0  $\mu$ M, 10 mM Tris/HCl, pH=8.2, 0.18% SDS, 22°C).

Sowohl die Absorptionsbande wie auch die Emissionsbande sind in ihrer Lage und Form denen von RPA, RDA und dem verwendeten Fluorophor Rhodamin B base sehr ähnlich. Das Anregungsmaximum liegt bei allen drei Verbindungen bei  $563 \pm 1$  nm, die Emissionsmaxima zeigen eine geringe Variation innerhalb von 8 nm um 597 nm. In der nachfolgenden Tabelle sind die verschiedenen Maxima von RPA, RDA und PIRO aufgelistet.

Fluoreszenzsonde	Absorptionsmaximum [nm]	Emmissionsmaximum [nm]
RPA	563	601
RDA	562	598
PIRO	563	593

Tabelle 1 : Emmissions- und Absorptionsmaxima von RPA, RDA und PIRO, (Konzentration der Fluoreszenzsonden 10.0  $\mu$ M im Tris/ HCl-Puffer, pH=8.2 und 0.18% SDS)

Desweiteren sollte geklärt werden ob Änderungen des pH-Wertes die Fluoreszenzeigenschaften der Sonde beeinflussen. Die Änderung des pH-Wertes hatte keinerlei Einfluss auf die Intensitäten und die Lage der Maxima. In der nachfolgende Abbildung sind die rel. Fluoreszenzintensitäten bei 5 verschiedenen pH-Werten aufgezeigt.

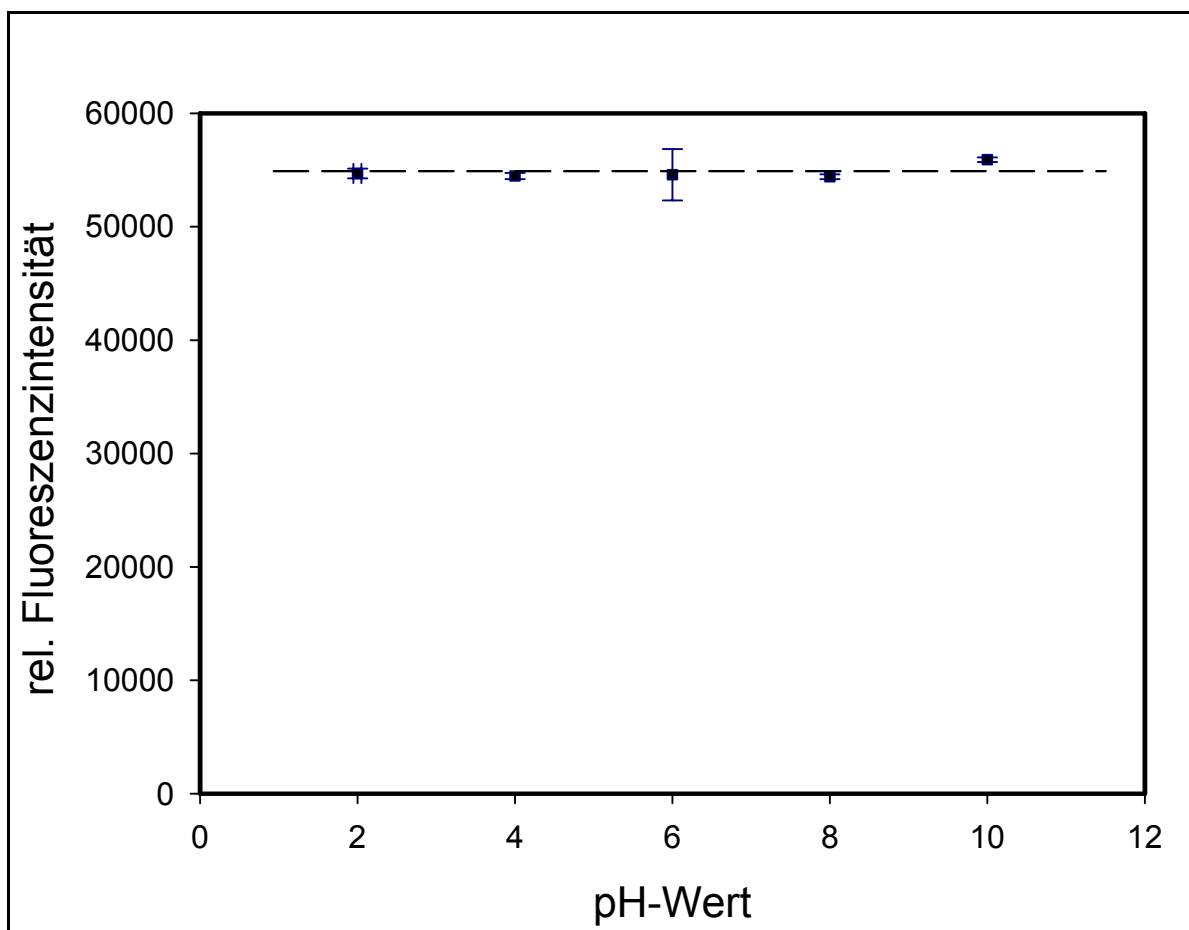


Abbildung 28 : Relative Fluoreszenzintensität von PIRO bei verschiedenen pH-Werten (Wasser, 0.18%SDS, 22°C, mit NaOH und HCl eingestellt),  $\lambda_{\text{exc.}} = 563 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em.}} = 593 \text{ nm}$ .

Eine Voraussetzung, um die Menge an chelatisierbarem Fe(II) in den Mitochondrien quantifizieren zu können, ist eine lineare Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Konzentration der Sonde. Wie Abbildung 28 zeigt, wird dieses ebenso wie von RPA und RDA von der Sonde PIRO in einem Konzentrationsbereich von 0- 80  $\mu\text{M}$  erfüllt. Ab einer Konzentration von 90  $\mu\text{M}$  läuft die Kurve auf einen stationären Zustand zu. Diese Phänomen kann durch Selbstassoziation und damit verbundene Fluoreszenzlöschung erklären werden.

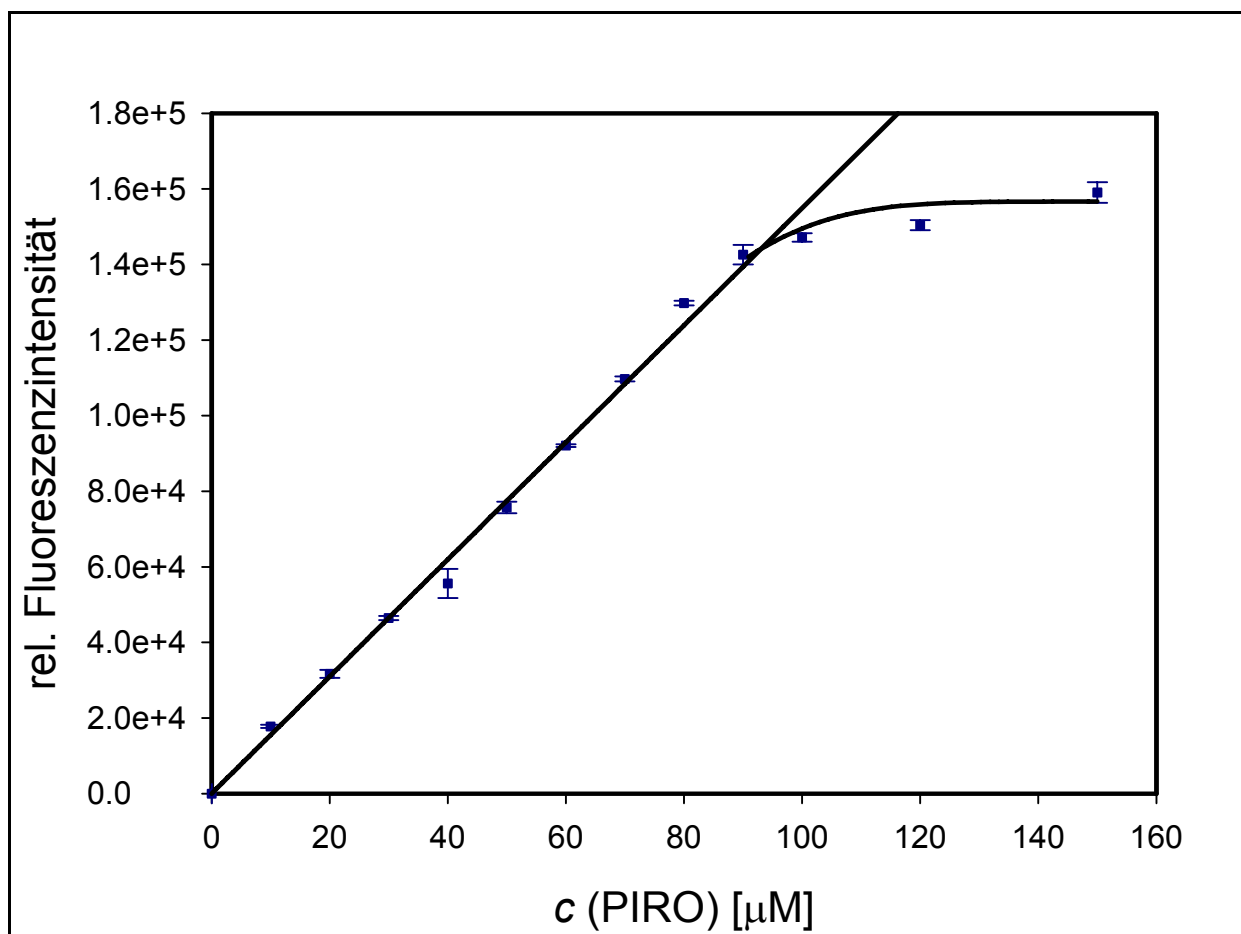


Abbildung 29: Konzentrations-Intensitätsverlauf PIRO, im Tris / HCl-Puffer, pH = 8.2, 0.18% SDS, 25°C,  $\lambda_{\text{exc.}} = 563 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em.}} = 593 \text{ nm}$ .

Die Konzentration der Fluoreszenzsonde kann anhand der Geradengleichung  $y = 57.35x$  ( $y \equiv \text{rel. Fluoreszenzintensität}$ ,  $x \equiv \text{Konzentration der Sonde } [\mu\text{M}]$ ,  $r^2=0.9877$ ) direkt ermittelt werden.

Wie bereits im vorangegangenen Abschnitt erläutert wurde, soll die Fluoreszenzsonde PIRO dazu dienen, festzustellen, ob und wie stark das chelatisierbare Eisen in den Mitochondrien an niedermolekulare Liganden gebunden ist. Dazu sollte im chemischen und zellulären System die Reaktion auf Fe(II) gezeigt werden. Aufgrund der Oxidationsempfindlichkeit des Fe(II) erwies es sich als schwierig, langzeitstabile Fe(III)-freie Lösungen herzustellen. Deshalb wurden Reduktionsmittel wie Ascorbat oder Glutathion zugegeben. Im Falle der Sonden RPA und RDA hatte dies keinerlei Auswirkungen auf die Fe(II) Komplexbildung, da die Chelatereinheiten 1,10-Phenanthrolin und Bipyridyl, in diesen Verbindungen eine hohe Komplexbildungskonstante für

Fe(II) im Vergleich zum Reduktionsmittel-Fe(II)-Komplex besitzen. Da der Chelator der Sonde PIRO, aber eine viel niedrigere Komplexbildungskonstante besitzt als Phenanthrolin bzw. Dipyridyl, ist zumindest für Ascorbat eine tatsächliche Konkurrenz hinsichtlich der Komplexierung von Fe(II) gegeben.

Dies wird bestätigt durch die in der nachfolgenden Tabelle zusammengestellten Wirkungsgrade verschiedener Übergangsmetallionen auf die Fluoreszenzintensität der drei Sonden. Die Messungen wurden zum einen in einem Tris-HCl gepufferten System bei pH=8.2, zum anderen in einem dem mitochondrialen System nachempfundenen Medium (Mito-Medium) ebenfalls bei pH = 8.2 (siehe Tabelle 3) durchgeführt.

Ion	RPA (%Ausgangs- fluoreszenz)	log K	RDA (%Ausgangs- fluoreszenz)	log K	PIRO (%Ausgangs- fluoreszenz)	log K
Ni <sup>2+</sup>	53	24.7	42	20.5	62	16.6
Cu <sup>2+</sup>	40	20.1	20	17.9	40	18.5
Co <sup>2+</sup>	77	20.6	60	16.2	51	13.8
Zn <sup>2+</sup>	82	18.3	92	14.0	97	12.5
Cu <sup>+</sup>	67	n.b.	93	n.b.	64	n.b.
Fe <sup>3+</sup>	96	n.b.	99	n.b.	99	n.b.
Fe <sup>2+</sup>	9	22.1	13	17.4	73	12.2

Tabelle 2: Einfluss verschiedener Übergangsmetallionen auf die Fluoreszenzintensität in % der Ausgangsfluoreszenz, in Puffer (Tris-HCl, p.H= 8.2, 0.18% SDS), 20 µM Fluoreszenzfarbstoff, 20 µM Kationenkonzentration. „n.b.“, nicht bekannt.

Die unterschiedlichen Löschungen der Fluoreszenz von RDA, RPA und PIRO durch die aufgeführten Kationen lassen sich durch die teilweise stark abweichenden Komplexbildungskonstanten erklären. Da die meisten dieser Kationen aber intrazellulär sehr niedrige Konzentrationen besitzen, stellen sie keine Konkurrenz zum Eisen dar. Die Reaktion auf Fe(III) ist bei allen drei Sonden sehr gering, so daß man davon ausgehen kann, dass vornehmlich Fe(II) erfasst wird. Die geringe Löschung der PIRO-Fluoreszenz lässt sich durch die im Vergleich zu anderen im System vorhandenen potentiellen

Chelatoren, niedrige Komplexbildungskonstante der Chelatereinheit erklären. Der Puffer Tris(hydroxymethyl)aminoethan (TRIS) kann natürlich ebenfalls Eisen chelatisieren, wenn auch vermutlich nur mit einer niedrigen Komplexbildungskonstante. Dafür liegt es aber in einer sehr hohen Konzentration von 10 mM vor, was die Lage des Komplexgleichgewichtes in Richtung Puffer-Fe(II)-Komplex verschiebt. Die Eisen(II)-Lösung wird wie in Abschnitt 7.5 beschrieben, aus einer Lösung von Mohr'schem Salz in Wasser unter Zugabe von Citrat und Ascorbat hergestellt. Da das Reduktionsmittel Ascorbat, aufgrund seines hohen , ebenfalls in Konkurrenz zur Sonde tritt, wurde zusätzlich eine Messung ohne die Zugabe dieses Reduktionsmittels durchgeführt. Um eine mögliche Oxidation von Fe(II) zu Fe(III) so niedrig wie möglich zu halten, wurde die Messung direkt nach Auflösung des Mohr'schen Salzes durchgeführt.

Ion	RPA (%Ausgangsfluoreszenz)	PIRO (%Ausgangsfluoreszenz)
Fe <sup>2+</sup>	37%	45%

Tabelle 3: Messung der Fluoreszenzintensität, 20 µM Sonde, RPA + 6.7µM Fe(II), PIRO + 10µM Fe(II), Wasser, 0.18% SDS.

Zur Kontrolle wurde die Messung ebenfalls mit RPA durchgeführt, da dessen Fluoreszenz durch reine Fe(II)-Lösung vollständig gelöscht werden sollte. Da die Ausgangsfluoreszenz bei RPA jedoch nur auf einen Wert von 37% fiel, ist davon auszugehen, dass ein gewisser Fe(II)-Anteil schon zu Fe(III) oxidiert wurde. Die Messung zeigte weiterhin, dass die Fluoreszenz von PIRO mit Eisen(II) bis zu einem gewissen Grad quenchbar ist, wenn keine Konkurrenz mit anderen Chelatoren möglich ist.

Eine weitere Messreihe wurde in einem dem natürlichen mitochondrialen Medium nachempfundenen Medium, dem sogenannten Mito-Medium durchgeführt. Dieses Medium enthält viele Bestandteile, welche auch in der mitochondrialen Matrix vorhanden sind.

Ion	RPA	RDA	PIRO
	(%Ausgangsfluoreszenz)	(%Ausgangsfluoreszenz)	(%Ausgangsfluoreszenz)
Ni <sup>2+</sup>	78%	15%	87%
Cu <sup>2+</sup>	23%	68%	72%
Co <sup>2+</sup>	38%	50%	90%
Zn <sup>2+</sup>	93%	93%	99%
Cu <sup>+</sup>	91%	93%	95%
Fe <sup>3+</sup>	88%	94%	98%
Fe <sup>2+</sup>	5%	6%	93%

Tabelle 4: Einfluss verschiedener Kationen auf die Fluoreszenzintensität (% der Ausgangsfluoreszenz) im Mito-Medium, 20 µM Fluoreszenzfarbstoff, 20 µM Kationenkonzentration.

Die Sonde PIRO zeigt bis auf eine geringe Quenchung keine Reaktionen durch die Zugabe von Übergangsmetallionen. Die Annahme, dass die in diesem System vorhandenen Chelatoren in Konkurrenz zur Sonde stehen, findet in diesen Ergebnissen eine Bestätigung. Die Messergebnisse zeigen weiterhin, dass die Sonden RPA und RDA auch in dem Mito-Medium sehr gut auf Fe(II) reagieren.

## 4.2 Lysosmale Fluoreszenzsonden

### 4.2.1 Phenac

Von der entwickelten Fluoreszenzsonde wurde zunächst ein Anregungs- und Fluoreszenzspektrum aufgenommen, um die Anregungswellenlänge und die Emmisionswellenlänge für die nachfolgenden zellulären Messungen zu erhalten. Die Spektren wurden in Wasser, welches zuvor von Schwermetallionen befreit wurde, unter Zusatz von 0.18% Sodiumdodecylsulfat (SDS), als Lösungsvermittler, aufgenommen.



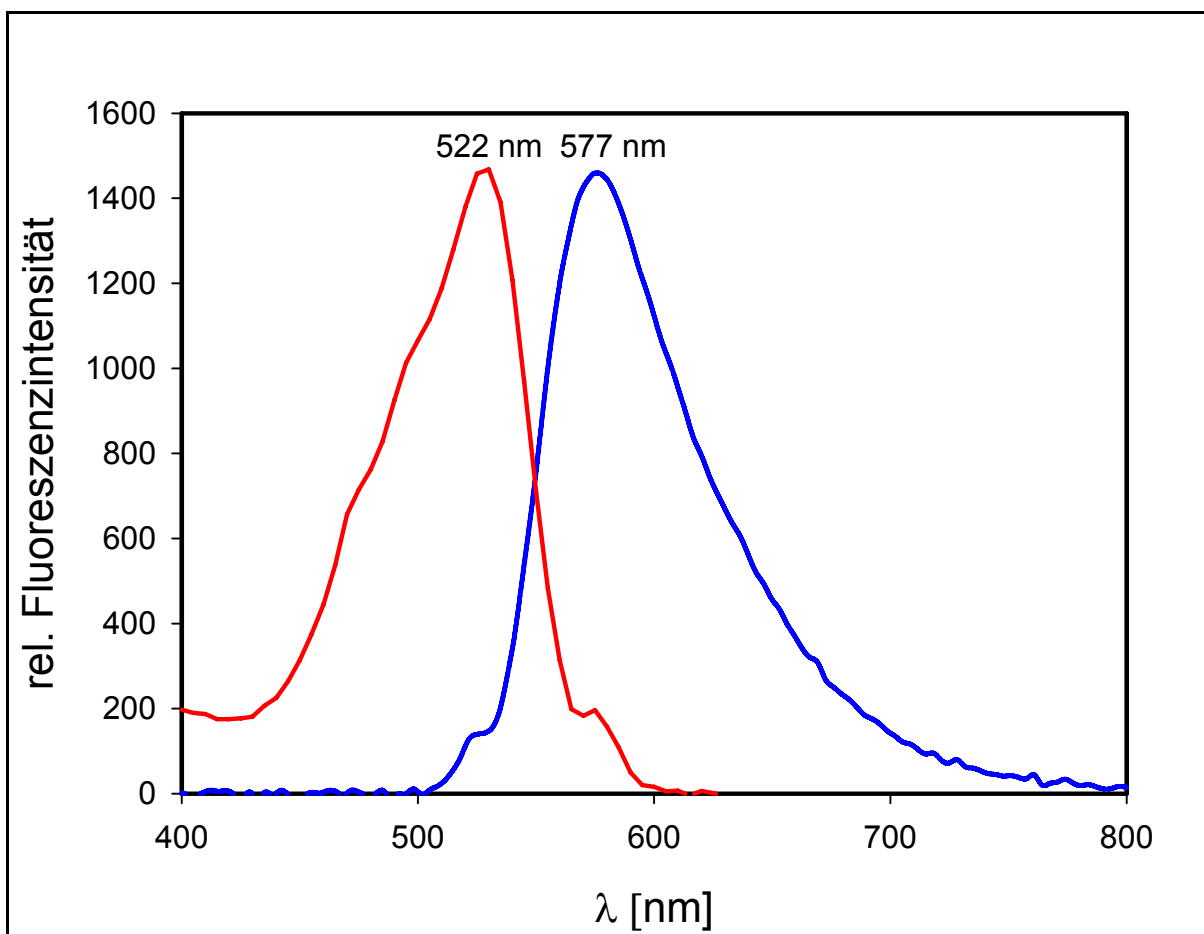


Abbildung 30: Anregungs- und Emmisionsspektrum von Phenac (10 $\mu$ M, Acetat-Puffer, pH = 4.5 )

Die Verbindung besitzt ein Anregungsmaximum von  $522 \pm 1$  nm und ein Emmisionsmaximum von  $577 \pm 1$  nm. Da für die zellulären Messungen aus apparativen Gründen nur Anregungen bei 488 nm und 514 nm möglich sind, und die Anregungswellenlänge 514 nm im Bereich des Emmisionsspektrums der Verbindung liegt, wurde für die zellulären Messungen eine Anregung von 488 nm gewählt.

Die pH-Insensitivität der Fluoreszenz einer Sonde ist für die angestrebte Verwendung in zellulären Systemen von großer Bedeutung. In der Zelle können pH-Werte von pH 4 bis pH 8.5 vorliegen. Die Fluoreszenzeigenschaften jeder Sonde sollten also in diesem pH-Bereich gleich sein. Um dies zu überprüfen wurde eine 20  $\mu$ M wässrige Lösung des Fluoreszenzfarbstoffes bei verschiedenen pH-Werten, eingestellt mit einer je 1M Lösung NaOH und HCl, vermessen.

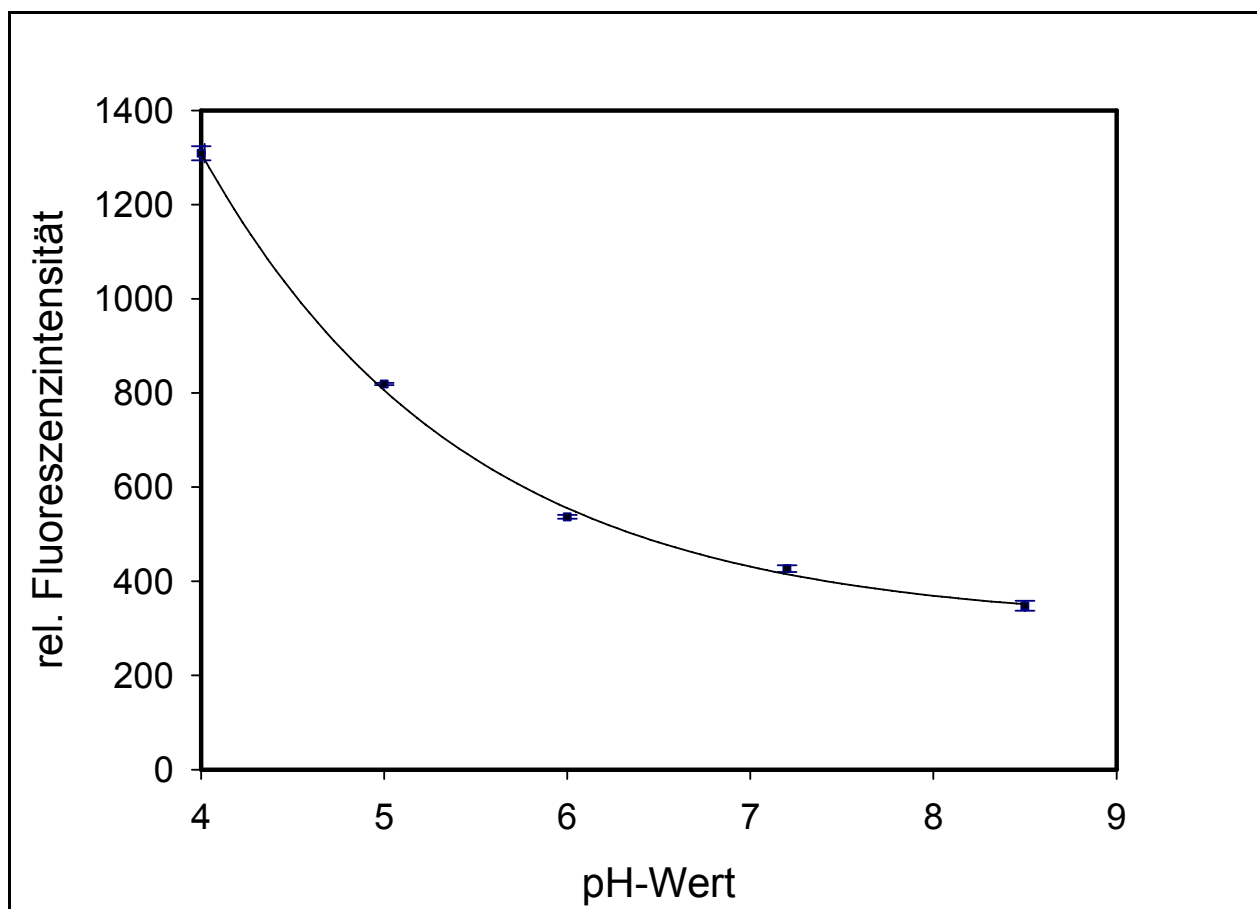


Abbildung 31: Relative Fluoreszenzintensität einer 20 µM Lösung Phenac bei verschiedenen pH-Werten (Wasser, 0.18% SDS, 22°C, mit NaOH und HCl eingestellt),  $\lambda_{ab.} = 522 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{exc.} = 577 \text{ nm}$ .

Die Messreihe ergab, wie in Abbildung 31 dargestellt, eine direkte Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität vom eingestellten pH-Wert. Der dargestellte Verlauf unterliegt keinem relevanten mathematischen Zusammenhang, sondern dient nur der Visualisierung der pH-Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität. Das Emmisionsmaximum veränderte nicht seine Lage, aber die Fluoreszenzintensität sank mit steigendem pH-Wert.

Um eine quantitative Bestimmung chelatisierbaren Eisens durchzuführen, ist es essentiell, eine Kalibrierung<sup>[85, 118]</sup> bezüglich der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der  $\text{Fe}^{2+}$ -Konzentration durchzuführen. Die Konzentration des chelatisierbaren Eisens kann anhand der Konzentrationsdifferenz der frei vorliegenden

Fluoreszenzsonde vor und nach Zugabe eines Entquenchers (zweiter Chelator im Überschuss), mit Hilfe dieser Kalibrierungsgeraden bestimmt werden. Die Differenz der im zellulären System beobachteten Fluoreszenzintensität vor und nach Entquenchung ist demnach proportional zur vorhandenen Menge an chelatisierbarem Eisen.

Um die Kalibrierungsgerade zu erstellen wurden das Emmisionsmaximum gegen die jeweilige Indikatorkonzentrationen aufgetragen. Die Messungen wurden in einem von Schwermetallionen befreiten Acetat-Puffer (pH = 4.7) unter Zusatz von 0.18% SDS durchgeführt.

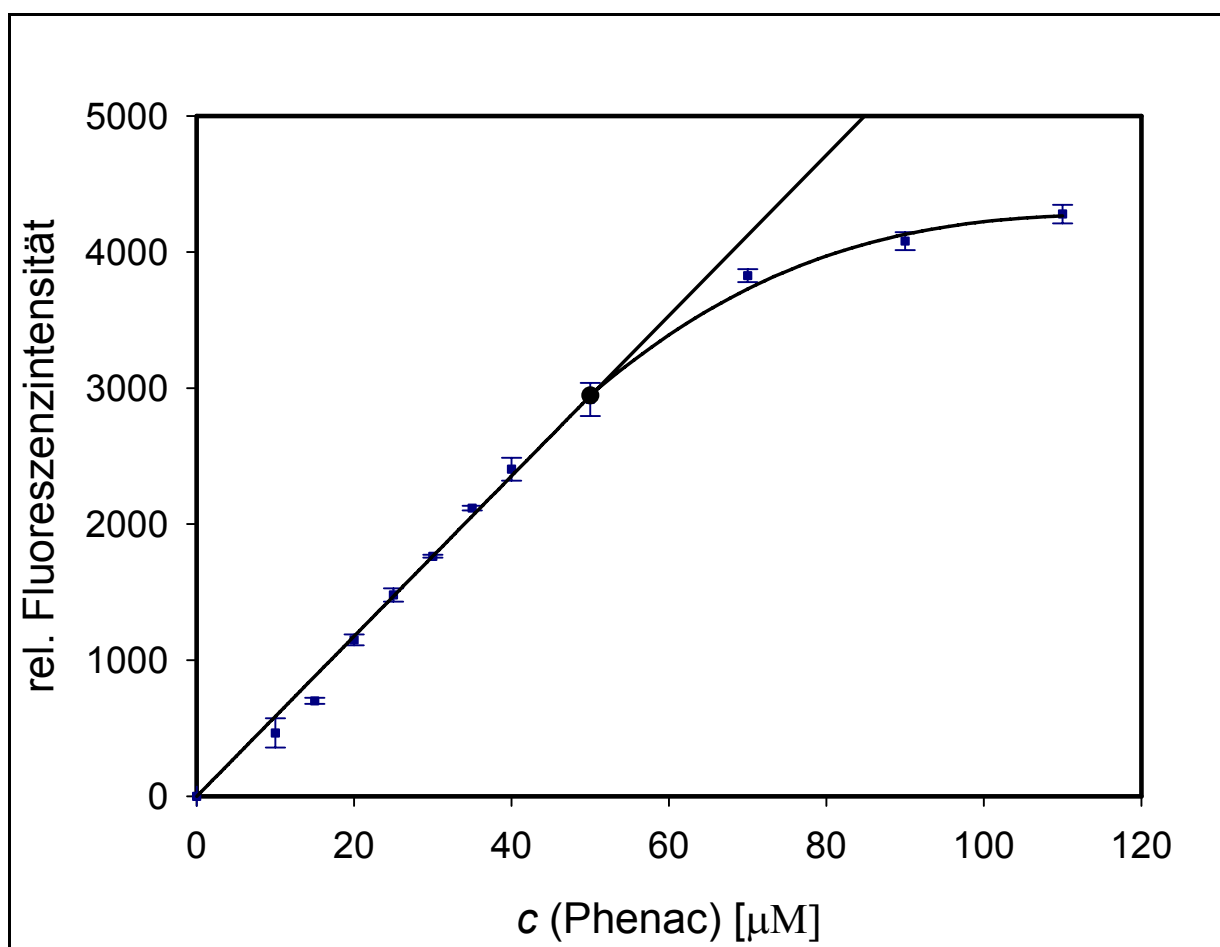


Abbildung 32: Konzentrations-Intensitätsverlauf Phenac, Wasser, pH = 4.7, 0.18% SDS, 25°C.

Wie die Abbildung 32 zeigt ist eine lineare Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Indikatorkonzentration, in einem Bereich von 0-60 μM gegeben. Für diesen Bereich

kann die gemessene rel. Fluoreszenzintensität direkt in die Konzentration der Fluoreszenzsonde mit Hilfe der Geradengleichung  $y = 58.53x$  ( $r^2=0.9937$ ) umgerechnet werden.

Ein weiteres wichtiges Kriterium für die Quantifizierung chelatisierbaren Eisens ist die stöchiometrische Löschung der Fluoreszenzintensität der Sonde durch Fe(II). Zur Überprüfung wurden zwei unterschiedlich konzentrierte Farbstofflösungen mit Aliquoten einer Fe(II)-Lösung (siehe Abschnitt 8.5.1) versetzt. Die Messungen erfolgten wiederum in einem Acetat-Puffer (pH 4.7) unter Zusatz von 0.18% SDS, bei 37°C und konstanter Anregungswellenlänge. In der nachfolgenden Abbildung sind die Emmisionsmaxima der Sonde gegen die Fe(II)-Ionenkonzentration aufgetragen.

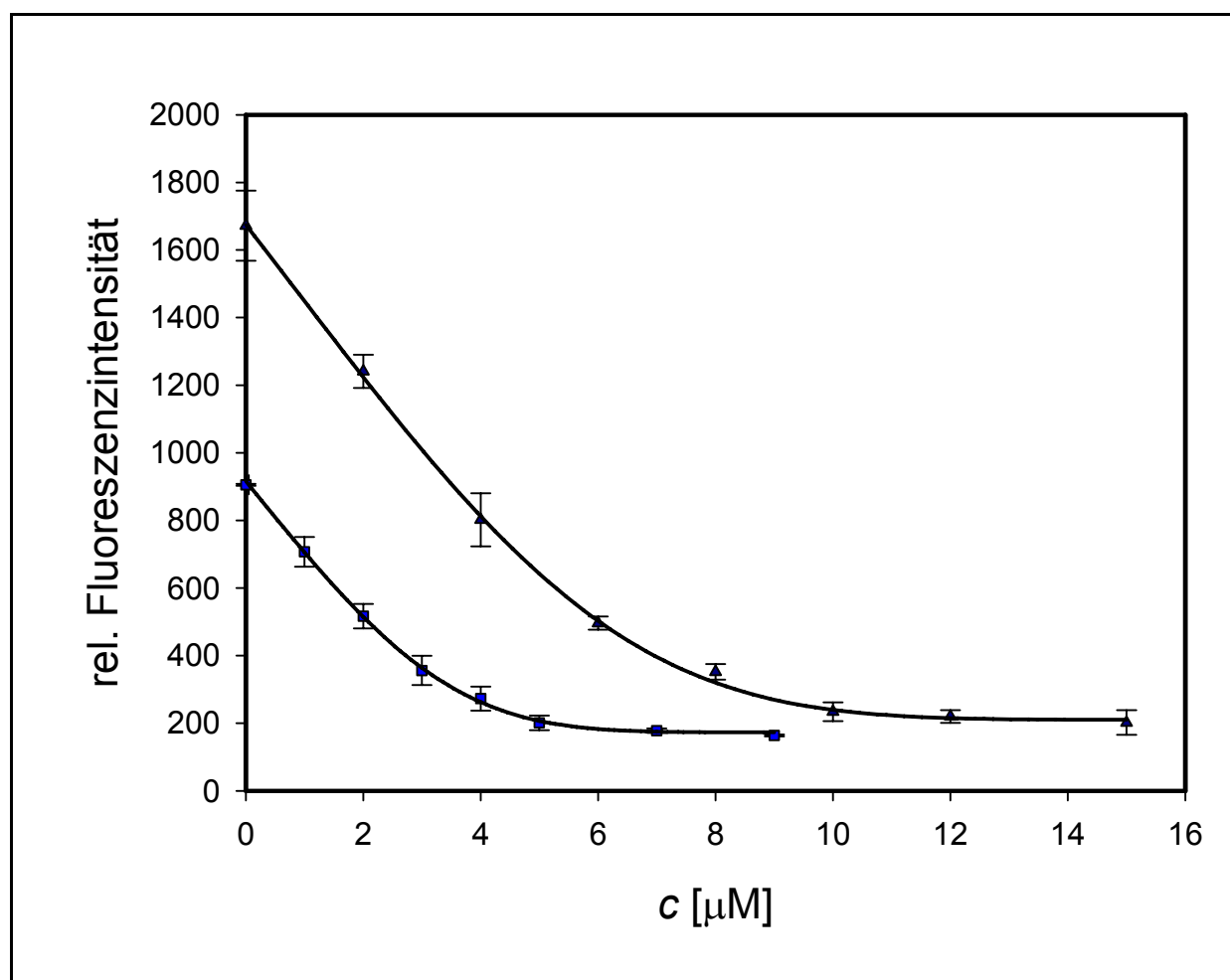


Abbildung 33: Intensitätsverlauf Phenac 30µM und 15 µM, Wasser, pH = 4.7, 0.18% SDS, 25°C, mit Zugabe von Fe<sup>2+</sup>-Lösung.

In der Abbildung sind die Verläufe der Fluoreszenzintensitäten bei sukzessiver Zugabe einer Fe(II)-Lösung zur Indikatorlösung aufgezeigt.

Unabhängig von der Konzentration der Fluoreszenzsonde ist die Fluoreszenzintensität nach Zugabe der stöchiometrischen Fe(II)-Menge maximal gelöscht bzw. „gequencht“. Die erwartete 1:3 (Fe(II)/Sonde)-Stöchiometrie ist somit gegeben.

Die Sonde reagierte zwar stöchiometrisch auf Eisen und besaß einen linearen Konzentrations-Intensitätsverlauf, hatte jedoch in der pH-Abhängigkeit einen entscheidenden Nachteil. Wird ein Entquencher, in diesem Fall 5-Amino-1,10-phenanthrolin im Überschuss auf die Zellen gegeben, so ist dieser in der Lage, das an die Sonde gebundene Fe(II) zu chelatisieren. Die Entquenchung führt zu einem Anstieg der Fluoreszenzintensität, die Anreicherung des Entquenchers aber auch zu einer Alkalisierung der Lysosomen und somit zu einem Abfall der Intensität. Da beide Prozesse ablaufen, kann diese Sonde nicht zur Bestimmung der Fe(II)-Konzentration verwendet werden.

#### **4.2.2 BDA**

Im ersten Schritt wurde ein Absorptions- und Fluoreszenzspektren aufgenommen, um die jeweiligen Maxima für die zellulären Messungen festzulegen. Die Spektren wurden in einem Acetat-Puffer (pH 4.7) aufgenommen, welcher zuvor von Schwermetallionen befreit und mit 1M NaOH und 1M HCl auf einen lysosomalen pH-Wert von 4.5 eingestellt wurde. Ein Zusatz von 0.19% Natriumdodecylsulfat als Lösungsvermittler für die Sonde erfolgte erst kurz vor der Messung.

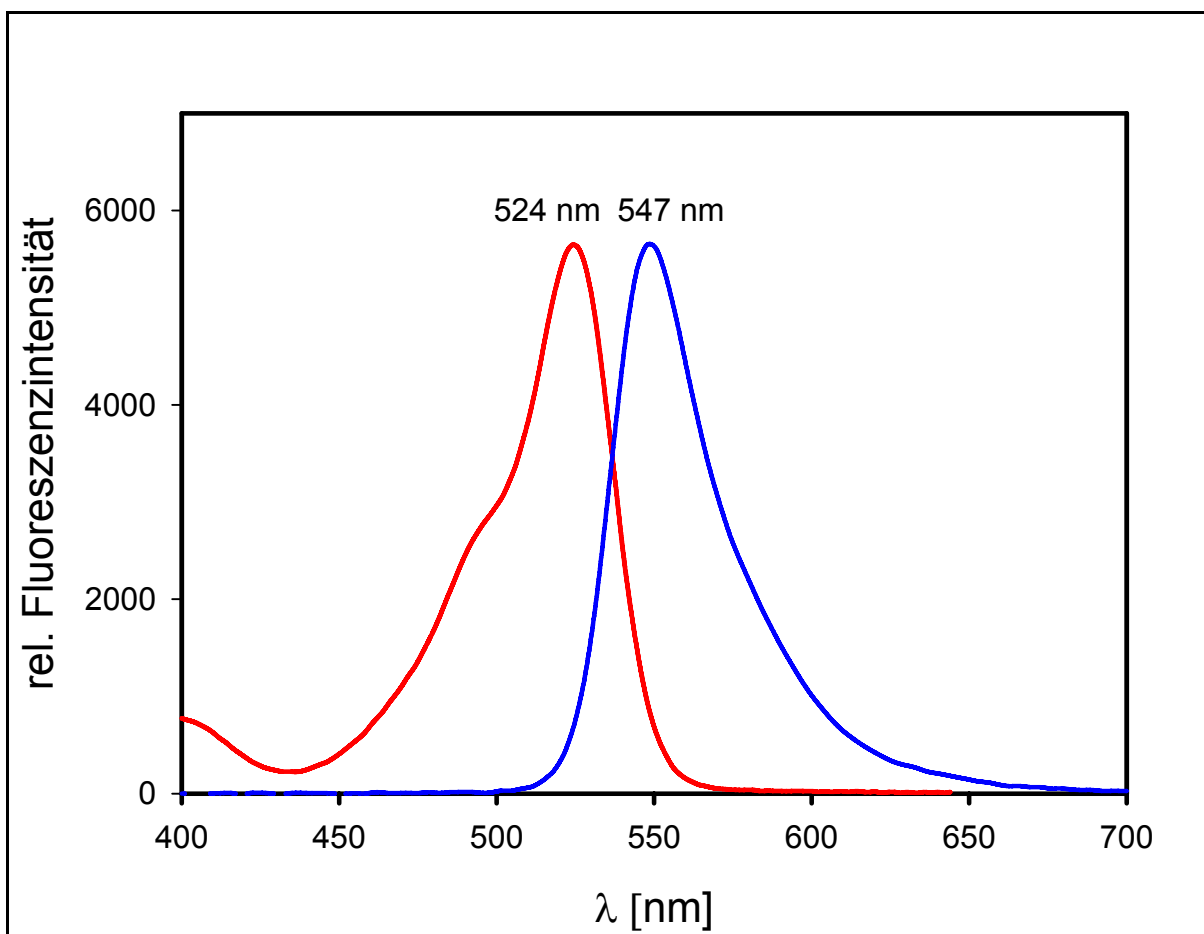


Abbildung 34 : Anregungs- (---) und Emissionsspektrum (---) von BPA (10  $\mu$ M, Acetatpuffer, pH=4.7, 0.19% SDS, 22°C).

Für die zellulären Messungen steht ein Argon-Laser zur Verfügung der in der Lage ist, die Wellenlängen 488 nm oder 514 nm einzustrahlen. Da das Anregungsmaximum bei 520 nm liegt, wurde für die zelluläre Anwendung eine Anregungswellenlänge von 488 nm gewählt, da die Anregungswellenlänge sonst im Bereich der Fluoreszenzwellenlänge der Sonde liegen würde.

Die pH-Unabhängigkeit der Fluoreszenzintensität ist einer der wichtigsten Kriterien im Hinblick auf die Anwendbarkeit der Fluoreszenzsonde. Aus diesem Grunde wurde die Fluoreszenzintensität bei verschiedenen pH-Werten überprüft. Es wurden wässrige Lösungen verwendet, in denen SDS als Lösungsvermittler in einer Konzentration von

0.19% vorhanden war. Die verschiedenen pH-Werte wurden mit 1 M HCL und 1M NaOH eingestellt.

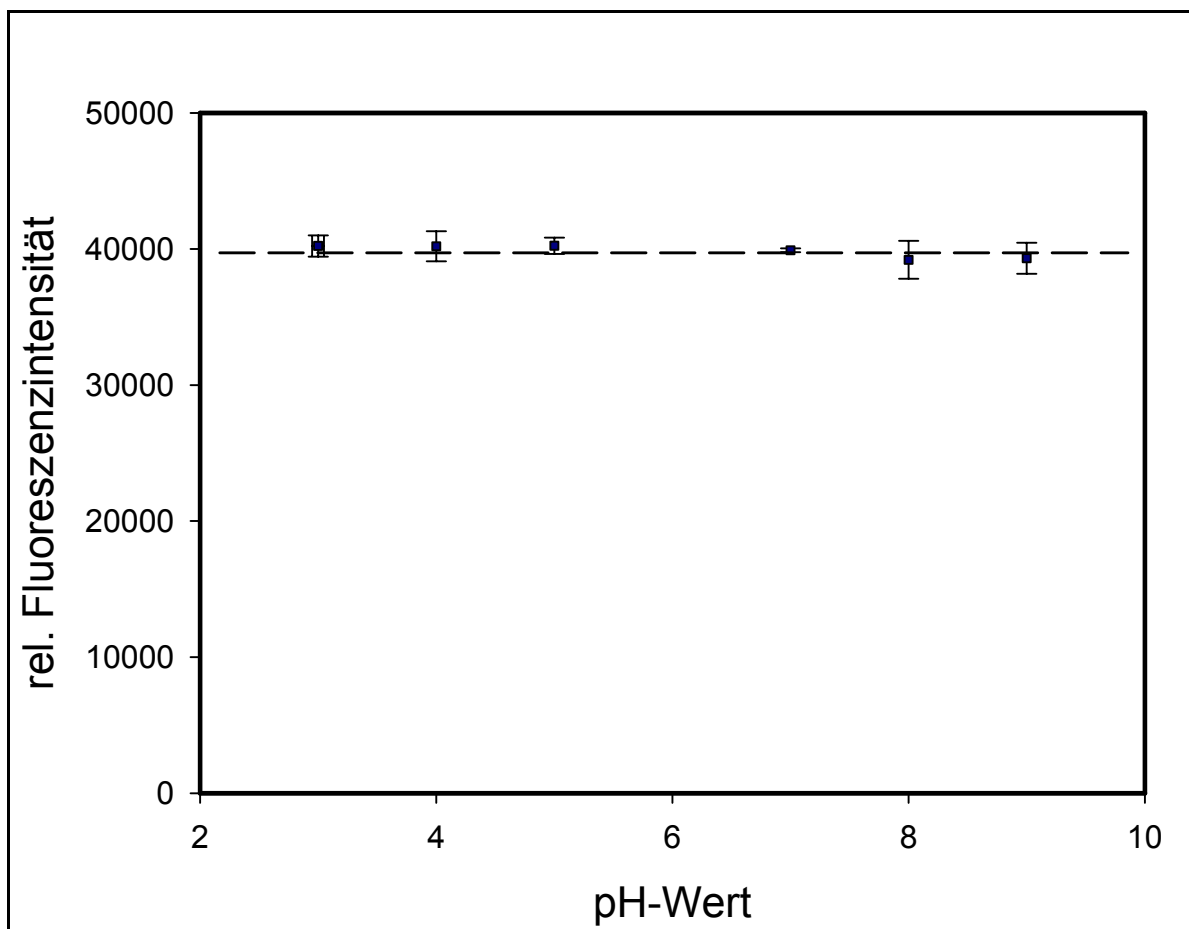


Abbildung 35 : Relative Fluoreszenzintensitäten bei verschiedenen pH-Werten, 10  $\mu$ M BPA, 0.19% SDS, 37°.

Wie in Abbildung 35 zu sehen ist, konnte kein signifikanter Einfluß des pH-Wertes auf die rel. Fluoreszenzintensitäten beobachtet werden. Die Intensität bleibt innerhalb der Fehlergrenzen konstant.

Eine weitere wichtige Voraussetzung, um die Menge an chelatisierbaren Fe(II) in den Lysosomen und Endosomen quantifizieren zu können, ist eine lineare Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Konzentration der Sonde. In der nachfolgenden

Abbildung sind die Fluoreszenzmaxima verschiedener Konzentrationen von BPA aufgeführt.

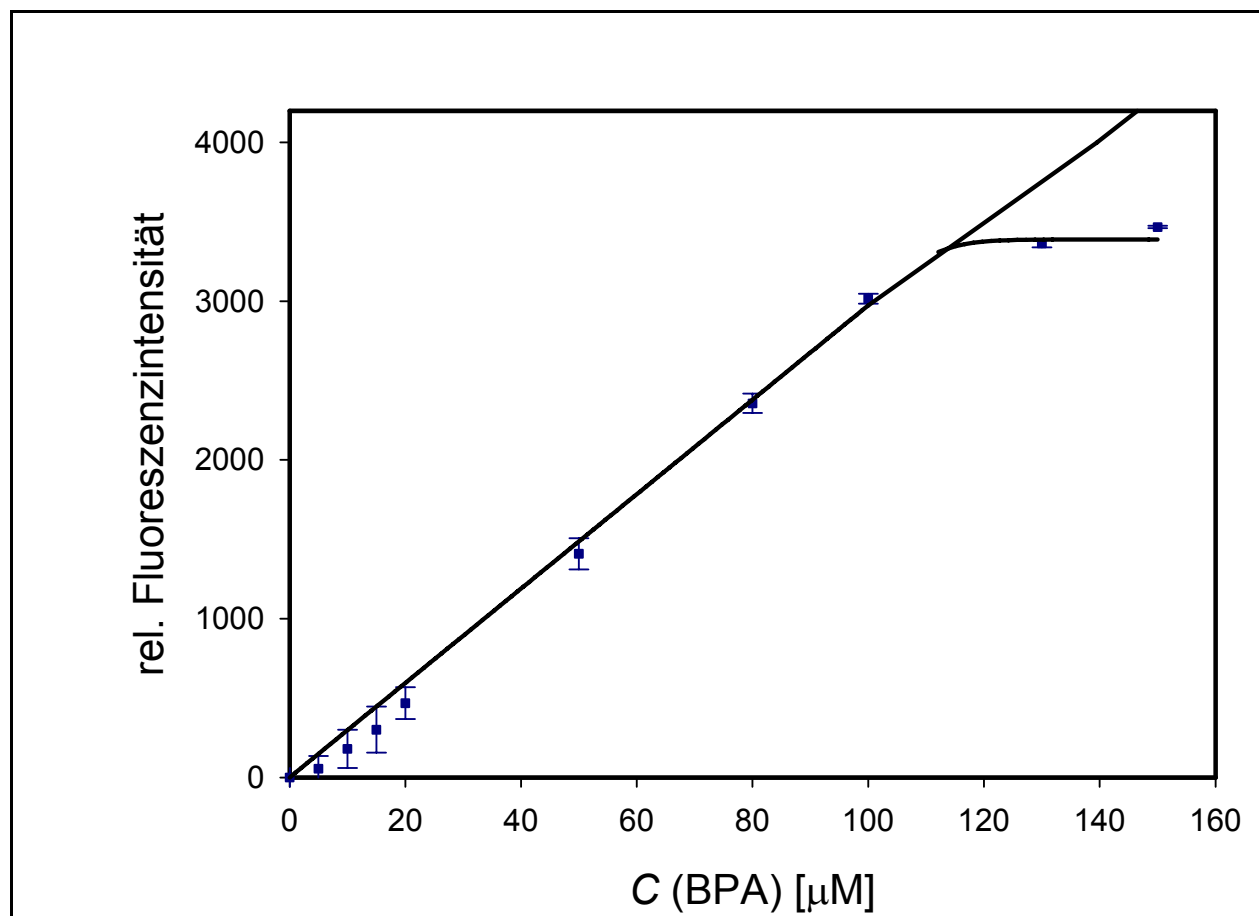


Abbildung 36 : Konzentrations-Intensitätsverlauf BDA, Acetat-Puffer, pH=4.5, 0.19% SDS, 37°C

Bis ungefähr zu einer Konzentration von 80-100 μM steigt die Fluoreszenzintensität mit wachsender Konzentration an BPA linear an. Die Konzentration der Sonde kann in diesem Bereich direkt über die gemessene rel. Fluoreszenzintensität über die Geradengleichung  $y = 28.66x$  ( $r^2 = 0.9863$ ) berechnet werden. Oberhalb von 100 μM bleibt die Fluoreszenz konstant, welches wieder durch die Selbstassoziation und die damit verbundene Fluoreszenzlöschung zu erklären ist.

Erfahrung mit anderen Fluoreszenzsonden, wie RDA, ließen vermuten, dass auch die dargestellte Sonde BPA, deren Chelatereinheit ebenfalls eine Dipyridyleinheit ist, bei vollständiger Quenchung einen 1 : 3 Komplex mit Eisen (II) bildet. Zu unterschiedlich



konzentrierten Lösungen der Sonde wurde daher sukzessive eine Eisen(II)-Lösung gegeben. Betrachtet man die Fluoreszenzintensität, so kann man einen Abfall der Intensität beobachten.

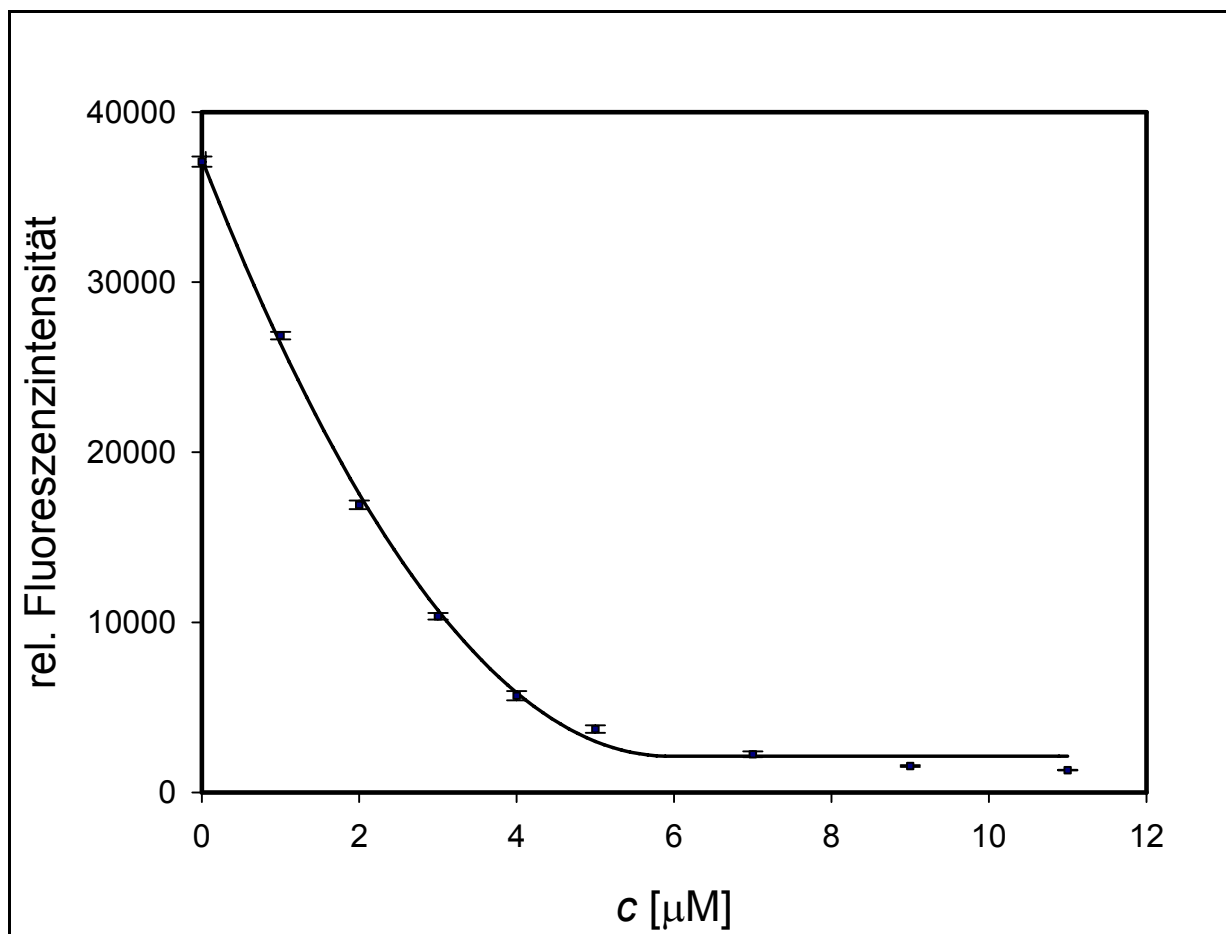


Abbildung 37 : Intensitätsverlauf BDA 15μM, Acetat-Puffer, pH=4.5, 0.19% SDS, 37°C, sukzessiver Zugabe einer Fe (II)-Lösung:

Abbildung 37 zeigt einen deutlichen Abfall der Fluoreszenzintensität nach Zugabe der Eisen(II)-Lösung. Das aufgeführte Beispiel zeigt, dass die Fluoreszenzintensität einer 15 μM Lösung BDA nach Zugabe von 5 μM Eisen(II)-Lösung maximal gelöscht wurde. Auch bei Konzentrationen von 10 und 30 μM BDA führt das Verhältnis von 1:3 Eisen zu Fluoreszenzsonde zu einer maximalen Quenchung der Fluoreszenzintensität. Die für die Quantifizierung des chelatisierbaren Eisens benötigte stöchiometrische Löschung der Fluoreszenz ist für die Sonde BDA somit gegeben.

Die Auswirkungen von anderen Kationen auf die Fluoreszenz der Sonde wurde ebenfalls überprüft. In der nachfolgenden Tabelle sind die Wirkungsgrade der Kationen dargestellt

Ion	Ni <sup>2+</sup>	Cu <sup>2+</sup>	Co <sup>2+</sup>	Zn <sup>2+</sup>	Cu <sup>+</sup>	Fe <sup>3+</sup>	Fe <sup>2+</sup>
% Ausgangsfluoreszenz	53	3	20	78	13	94	15

Tabelle 5: Einfluß verschiedener Kationen auf die Fluoreszenzintensität (% der Ausgangsfluoreszenz) im Acetat-Puffer, pH = 4.5, 20 µM Fluoreszenzfarbstoff, 20 µM Kationenkonzentration.

Die Messungen wurden in einem Acetat-Puffer bei pH 4.5 durchgeführt, um den vorherrschenden pH in den sauren Kompartimenten bei den Messungen zu beachten. Die Sonde zeigte eine starke Fluoreszenzlöschung bei Zugabe von Cu(II), Cu(I) und Fe(II). Da die intrazellulären Kupferkonzentrationen aber sehr gering sind, hat dies keinerlei Einfluss auf den Einsatz der Sonde in zellulären Systemen. Es hat sich weiterhin gezeigt, dass die Reaktion auf Fe(III) sehr schwach ist. Bei Zugabe äquimolarer Mengen Fe(III)-Lösung zur Farbstofflösung wurde die Fluoreszenzintensität bis auf 94% ihrer Ausgangsfluoreszenz gelöscht. Die Sonde kann daher zum selektiven Nachweis von Fe(II) im zellulären System dienen.

## 5 Messungen im zellulären System

### 5.1 Mitochondriale Fluoreszenzsonde PIRO

Die Fluoreszenzsonde wurde zunächst auf ihre subzelluläre Verteilung hin untersucht. Da diese Sonde in direkter Reihe zu den bereits entwickelten Sonden RPA und RDA steht, wurde unter den gleichen Bedingungen gemessen.

#### 5.1.1 Lokalisation in den Mitochondrien

Um den labilen Eisenpool in den Mitochondrien untersuchen zu können, muss die Sonde auch vollständig dort akkumulieren. Da die Zielsteuerungskomponente Rhodamin B wie bei RPA und RDA vorhanden ist, waren gleiche Akkumulationseigenschaften zu erwarten. Um die selektive Anreicherung der Sonde zu visualisieren, wurden Hepatozyten mit der Sonde PIRO und Rhodamin 123, einem literaturbekannten Mitochondrienmarker, beladen.

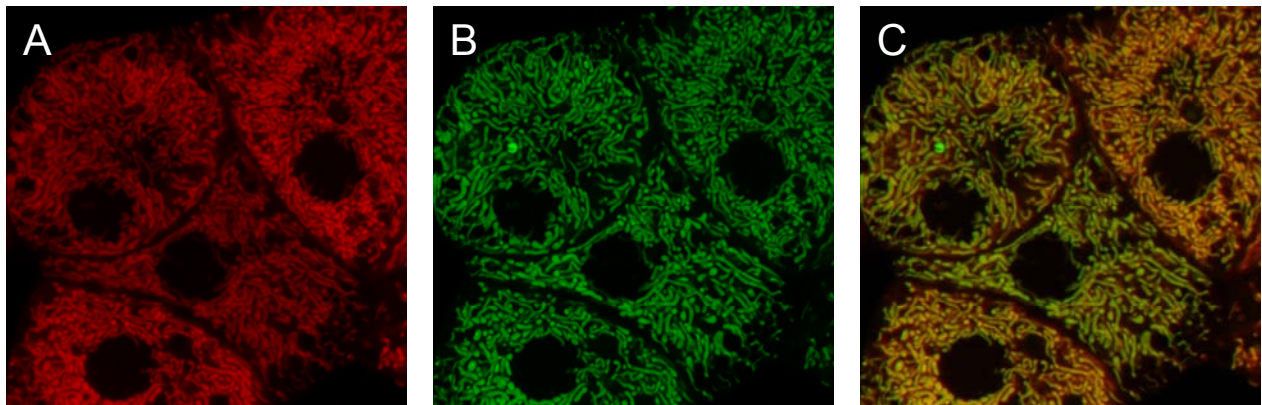


Abbildung 38 : Selektive intramitochondriale Lokalisation von PIRO in kultivierten Rattenhepatocyten. **(A)** intrazelluläre Verteilung der Sonde PIRO ( $\lambda_{exc}$ = 543 nm,  $\lambda_{em}$ ≥ 585 nm, 1.00  $\mu$ M Beladungskonzentration, HBSS, 37°C). **(B)** intrazelluläre Verteilung von Rhodamin 123 ( $\lambda_{exc}$ = 488 nm,  $\lambda_{em}$ = 505 – 530 nm, 1.00  $\mu$ M Beladungskonzentration, HBSS, 37°C). **(C)** Überlagerung der Bilder **(A)** und **(B)**

Die Beladungskonzentration wurde im Bereich von 0.20-1.00  $\mu$ M variiert. Die selektive Akkumulation in den Mitochondrien blieb, wie in der nachstehenden Abbildung zu erkennen ist, auch bei einer sehr großen Beladungskonzentration von 1.00  $\mu$ M erhalten.

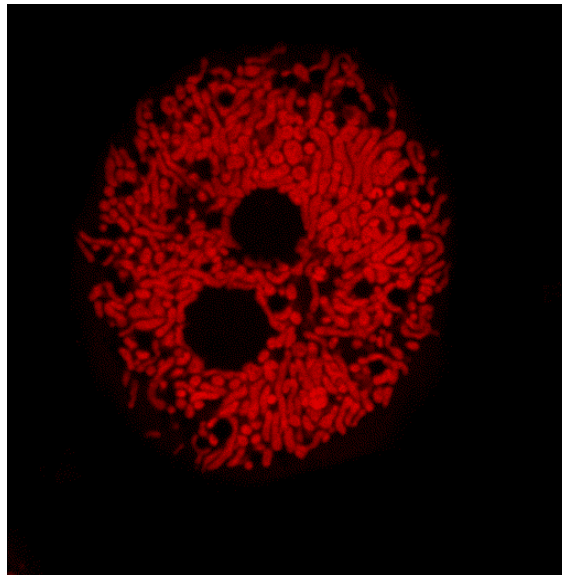


Abbildung 39 : Intramitochondriale Lokalisation von PIRO ( Beladungskonzentration 1  $\mu\text{M}$  in HBSS bei 37°C,  $\lambda_{\text{exc.}}$  = 543 nm,  $\lambda_{\text{em.}}$   $\geq$  560 nm)

Es konnte keine Beladung des Cytosols mit der Sonde festgestellt werden.

### 5.1.2 Konzentrationsbestimmung in den Mitochondrien

Die Konzentration der Fluoreszenzsonde PIRO in den Mitochondrien wurde anhand einer Kalibrierungsgeraden, in der die Fluoreszenzintensität gegen die Konzentration aufgetragen ist, bestimmt. An drei verschiedenen Tagen wurden Leberhepatozythen mit 1.00  $\mu\text{M}$  Fluoreszenzsonde beladen und die Konzentration in den Mitochondrien bestimmt. Es ergab sich folgende Konzentration von PIRO in den Mitochondrien:

1. Messung [ $\mu\text{M}$ ]	2. Messung [ $\mu\text{M}$ ]	3. Messung [ $\mu\text{M}$ ]	Mittelwert [ $\mu\text{M}$ ]
85.3	111.3	109.1	101.9 $\pm$ 14.4

Tabelle 6: Intramitochondriale Konzentration von PIRO, 0.2  $\mu\text{M}$  Beladungskonzentration

Im Durchschnitt liegt die Fluoreszenzsonde mit einer Konzentration von 102 $\pm$ 14  $\mu\text{M}$  in den Mitochondrien von Hepatozyten vor.

### 5.1.3 Löschung der Fluoreszenz in den Mitochondrien

Im Folgenden musste sichergestellt werden, dass die Fluoreszenzsonde Piro in den Mitochondrien auch auf  $\text{Fe}^{2+}$  reagiert. Dazu wurden Hepatozyten mit der Fluoreszenzsonde beladen ( $1.00 \mu\text{M}$  Beladungskonzentration in HBSS). Im Anschluss wurde der chelatisierbare Eisenpool in den Mitochondrien experimentell stark erhöht, indem der membranpermeable  $\text{Fe}^{3+}/8$ -Hydroxychinolin-Komplex in einer Konzentration von  $5.00 \mu\text{M}$  zugegeben wurde. Der verwendete Komplex besitzt den Vorteil der Membranpermeabilität und das im Komplex vorhandene  $\text{Fe}^{3+}$  wird durch das in der Zelle herrschende reduktive Milieu zu  $\text{Fe}^{2+}$  reduziert. In dieser Form ist es von der Sonde chelatisierbar.

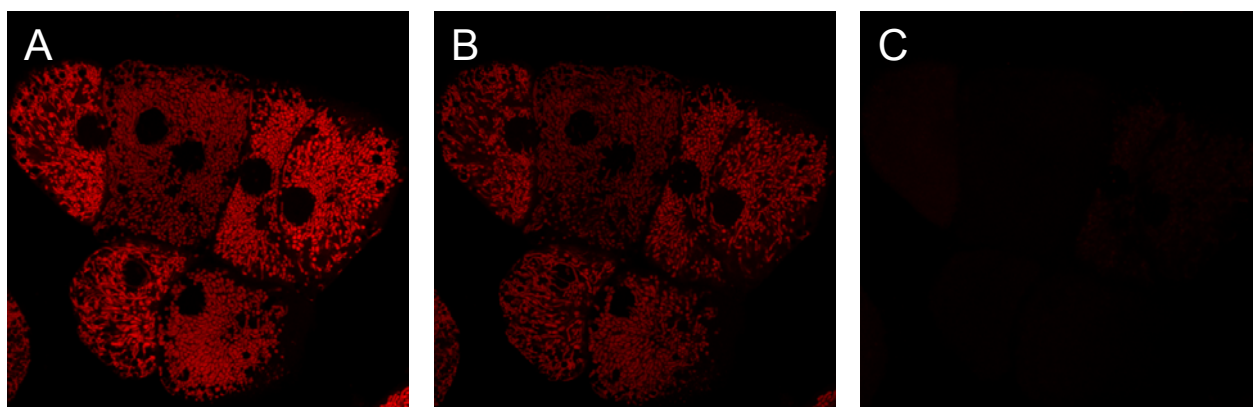


Abbildung 40 : Intrazelluläre Fluoreszenz der Fluoreszenzsonde Piro ( $1.00 \mu\text{M}$  Beladungskonzentration, HBSS,  $37^\circ\text{C}$ ,  $\lambda_{\text{exc.}} = 543 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em.}} \geq 560 \text{ nm}$ ). **(A)** vor Zugabe eines  $\text{Fe}^{3+}/8$ -Hydroxychinolin-Komplexes ( $10.0 \mu\text{M}$ ). **(B)** 5 Minuten Nach Zugabe **(C)** 15 Minuten nach Zugabe.

Die Abbildung zeigt einen deutlichen Abfall der Fluoreszenzintensität bereits 5 Minuten nach Zugabe des  $\text{Fe}^{3+}$ -Komplexes. Nach weiteren 10 Minuten ist die Fluoreszenz der Sonde fast vollständig gelöscht. Der Vergleich der benötigten Zeit bis zur vollständigen Löschung der Fluoreszenz zeigt, dass die Fluoreszenz der Sonden RPA und RDA bereits 5 Minuten nach Zugabe des Eisen (III)-Komplexes vollständig gelöscht ist. Der wesentliche Grund für die unterschiedlichen Zeiten liegt vermutlich in der niedrigeren

Komplexbildungskonstante der Fluoreszenzsonde PIRO von ( $\log \beta_2 = 12.2$ ), im Vergleich zu den Konstanten von RPA ( $\log \beta_3 = 21.2$ ) und RDA ( $\log \beta_3 = 16.0$ ).

#### 5.1.4 Entquenchung der Fluoreszenzintensität

Falls die neu entwickelte Sonde den chelatisierbaren Eisenpool in den Mitochondrien erfaßt hat, sollte ein Teil ihrer Fluoreszenz gelöscht sein. Gibt man nun einen zweiten Chelator, in diesem Fall PIH, im Überschuss hinzu, so müsste die Löschung der Fluoreszenz aufgehoben werden, da das gebundene Eisen von der Sonde entfernt wird. Um einen direkten Vergleich zu den „stärker“ chelatisierenden Sonden RPA und RDA zu bekommen, wurde der nachfolgende Versuch unter vergleichenden Bedingungen mit RDA und PIRO durchgeführt. Hepatozyten wurden mit je 1.00  $\mu\text{M}$  der Fluoreszenzsonden beladen. Im Anschluss wurde der Chelator PIH in einer Konzentration von 2.00 mM zugesetzt und die Entwicklung der Fluoreszenz beobachtet.

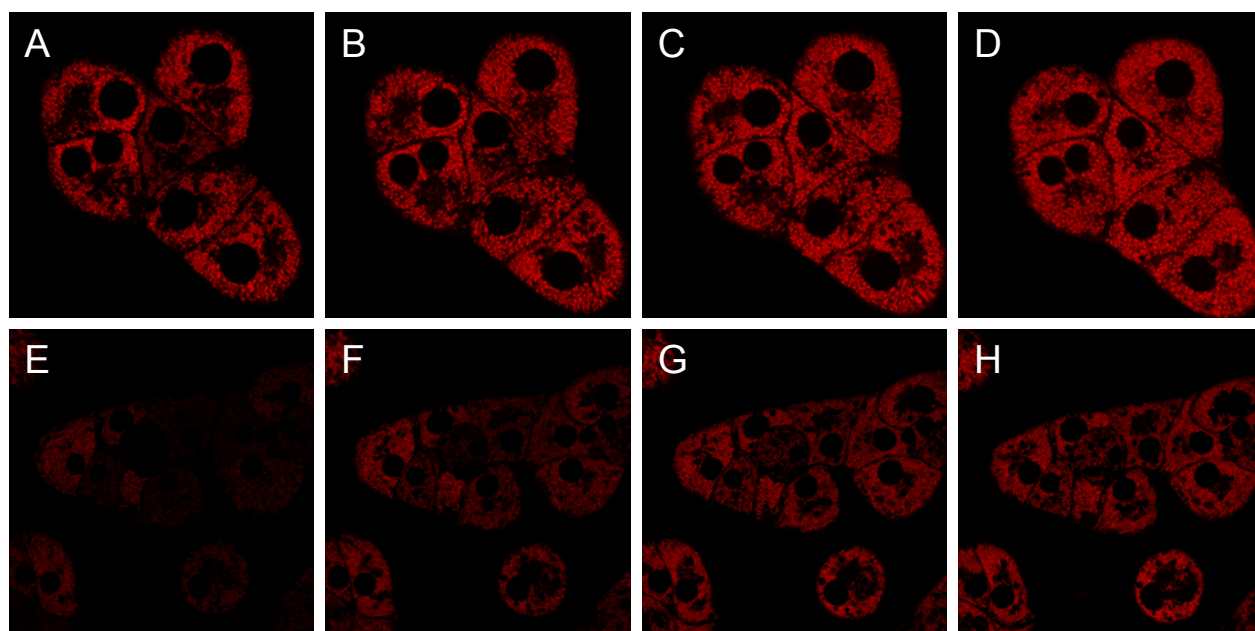


Abbildung 41 : Intramitochondriale Fluoreszenz der Sonde Piro (**A-D**) und RDA (**E-H**) (je 1.00  $\mu\text{M}$  Beladungskonzentration in HBSS, 37°C,  $\lambda_{\text{exc}} = 543 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em.}} \geq 560 \text{ nm}$ ) (**A, E**) vor Zugabe (**B, F**) 60 Minuten nach Zugabe von PIH, (**C, G**) 120 Minuten nach Zugabe, (**D, H**) 180 Minuten nach Zugabe von PIH (2 mM).

Bild E zeigt, dass die Fluoreszenzintensität von RDA durch das in den Mitochondrien vorhandene chelatisierbare Eisen(II) stark gelöscht wird. Nach Zugabe des starken Eisen-(II)-Chelators PIH im Überschuss steigt die Fluoreszenz stark an (Bilder F-H). Im Gegensatz dazu wird die Fluoreszenz der Sonde PIRO nur gering gelöscht (Bild A), da die Chelatereinheit nicht stark genug ist, das Eisen an die Sonde zu binden. Man kann deutlich erkennen dass die Intensität der Fluoreszenz vor und nach der Zugabe von PIH bei PIRO kaum ansteigt (Bilder B-D).

Die Menge an chelatisierbarem Eisen, welches mit der Fluoreszenzsonde PIRO erfasst werden konnte, wurde anhand von 3 Messungen an zwei verschiedenen Tagen bestimmt.

Tag 1		Tag 2	
Messung 1 [ $\mu\text{M}$ ]	Messung 2 [ $\mu\text{M}$ ]	Messung 3 [ $\mu\text{M}$ ]	Mittelwert [ $\mu\text{M}$ ]
1.7	nicht detektiert	2.5	$1.4 \pm 1.2$

Tabelle 7: Ermittelte Konzentration von  $\text{Fe}^{2+}$ -in Mitochondrien von Hepatozyten (  $1.00 \mu\text{M}$  Beladungskonzentration, HBSS,  $37^\circ\text{C}$ ), Kalibrierung in Tris/HCl-Puffer,  $\text{pH}=8.2$ .

In den Messungen 1 und 3 konnte nur eine geringe Menge an Fe(II) bestimmt werden. Die zweite Messung lieferte keinen Wert. Der geringe Mittelwert von  $1.4 \mu\text{M}$  Fe(II), im Vergleich zu den detektierten Mengen in Messungen mit RDA und RPA, zeigt deutlich, dass sich die Sonde in direkter Konkurrenz zu den im physiologischen System vorhandenen niedermolekularen Liganden befindet. Aufgrund der niedrigeren Komplexbildungskonstante der Chelatereinheit N,N-Bis(pyridin-2-yl-methyl)amin von  $\log \beta_2 = 12.2$  ist die Sonde Piro nicht in der Lage das Fe(II) des chelatisierbaren Eisenpools in den Mitochondrien nennenswert an sich zu binden.

Um den Nachweis zu erbringen, dass die Sonde in der Lage ist Fe(II), wenn es in ausreichender Konzentration vorliegt, nachzuweisen, wurden die nachfolgenden Messungen durchgeführt.



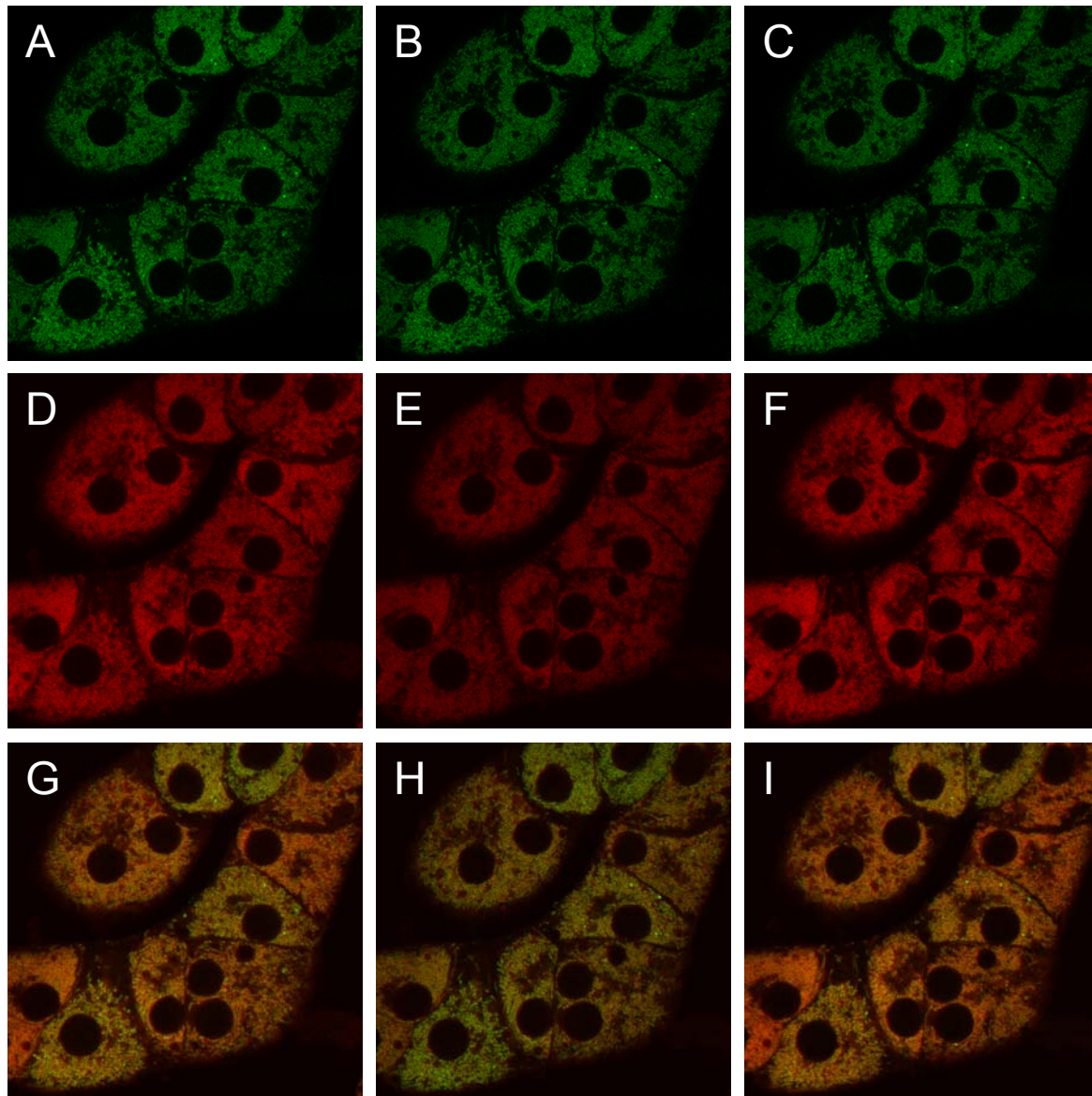


Abbildung 42 : Intramitochondriale Fluoreszenz von Rhodamin 110 und RDA in kultivierten Rattenhepatocyten. **(A)** Intrazelluläre Fluoreszenz von Rhodamin 110 ( $\lambda_{exc}= 488 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em}= 505 - 530 \text{ nm}$ ,  $1.00 \mu\text{M}$  Beladungskonzentration, HBSS,  $37^\circ\text{C}$ ), **(D)** Intrazelluläre Fluoreszenz der Fluoreszenzsonde PIRO ( $\lambda_{exc}= 543 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} \geq 585 \text{ nm}$ ,  $1.00 \mu\text{M}$  Beladungskonzentration, HBSS,  $37^\circ\text{C}$ ). **(B, E)** 5 Minuten nach Zugabe eines  $\text{Fe}^{3+}/8$ -Hydroxychinolin-Komplexes ( $5.00 \mu\text{M}$ ), **(C, F)** 60 Minuten nach Zugabe von PIH ( $2.00 \text{ mM}$ ). **(G-I)** Überlagerung der Bilder **(A-C)** und **(D-F)**.

Hepatozyten wurden je  $1.00 \mu\text{M}$  mit Rhodamin 123 und PIRO beladen. Bild A zeigt die grüne Fluoreszenz des Mitochondrien Markers Rhodamin 123. In Bild D erkennt man die rote Fluoreszenz der Fluoreszenzsonde PIRO. Die Aufnahmen B und E sind 5 Minuten nach Zugabe eines  $\text{Fe}^{3+}/8$ -Hydrochinolin-Komplexes entstanden. Man erkennt



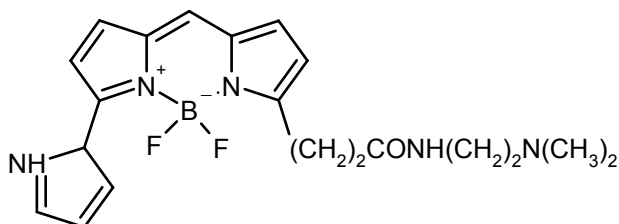
die deutliche Abnahme der Fluoreszenz der Sonde PIRO in Bild E. Die Fluoreszenz des Mitochondrienmarkers Rhodamin 123 in Bild B bleibt davon wie erwartet unbeeinflusst. Die Bilder C und F sind 60 Minuten nach Zugabe des Chelators PIH entstanden, was eine Zunahme der Fluoreszenz von PIRO zur Folge hat (Bild F). Bild C zeigt, dass die Zugabe des Chelators und die lange Inkubationszeit keinen Einfluss auf die Stabilität der Mitochondrien besitzt, da der Mitochondrien-Marker nach wie vor eine mitochondriale Lokalisation aufweist. Die Bilder G-H sind die jeweiligen Überlagerungen der Bilder A-C mit D-E. Man kann hier deutlich die Ab- und Zunahme der roten Fluoreszenz erkennen, während die grüne Fluoreszenz organellspezifisch dauerhaft vorliegt.

## 5.2 Lysosomale Fluoreszenzsonden

### 5.2.1 Phenac (4{[3,6-Bis(dimethylamino)acridin-9-yl]thio)methyl}-N-(1,10-phenanthrolin-5-yl)benzamid) (8)

#### 5.2.1.1 Lokalisation in den Lysosomen

Da sich in Vorversuchen gezeigt hatte, dass sich die entwickelte Sonde 4{[3,6-Bis(dimethylamino)acridin-9-yl]thio)methyl}-N-(1,10-phenanthrolin-5-yl)benzamid (8) „Phenac“, in den sauren Organellen der Zelle anreicht, wurden für die nachfolgenden Messungen Endothelzellen verwandt die für ihren hohen Anteil an Lysosomen und Endosomen bekannt sind. Um die spezifische Akkumulation in den sauren Organellen der Zelle nachzuweisen, wurden Endothelzellen mit je 1.00  $\mu\text{M}$  der Fluoreszenzsonde Phenac und lysosomalen Farbstoff Lyso-Tracker Red, einem BODIPY-Derivat, beladen.



"Lyso Tracker red"

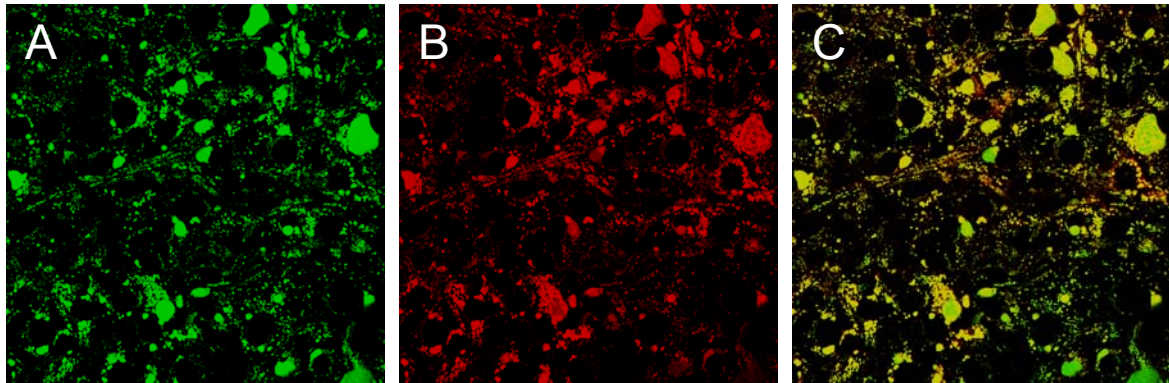


Abbildung 43 : Selektive intralysosomale Lokalisation von Phenac in Endothelzellen. **(A)** Intrazelluläre Verteilung der Sonde Phenac ( $\lambda_{exc}= 514\text{nm}$ ,  $\lambda_{em}= 530 - 600 \text{ nm}$ ,  $1.00 \mu\text{M}$  Beladungskonzentration, HBSS,  $37^\circ\text{C}$ ). **(B)** Intrazelluläre Verteilung von „Lyso Tracker red“ ( $\lambda_{exc}= 543 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em}\geq 585 \text{ nm}$ ,  $1.00\mu\text{M}$  Beladungskonzentration, HBSS,  $37^\circ\text{C}$ ). **(C)** Überlagerung der Bilder **(A)** und **(B)**

Bild A zeigt die grüne Fluoreszenz der Fluoreszenzsonde Phenac, im Bild B ist die rote Fluoreszenz des lysosomalen Trackers dargestellt. Die Überlagerung von Bild A und B ergibt Bild C. Man erkennt hieran, dass die Fluoreszenzsonde Phenac in den gleichen Kompartimenten akkumuliert ist wie der lysosomale Tracker. Die Akkumulation ist sehr spezifisch, da keine Fluoreszenz außerhalb der sauren Kompartimente beobachtet werden konnte.

Um die Konzentration der Fluoreszenzsonde in den Lysosomen und Endosomen zu bestimmen, wurden Endothelzellen mit Phenac beladen (je  $1.00 \mu\text{M}$  Beladungskonzentration, HBSS,  $37^\circ\text{C}$ ).

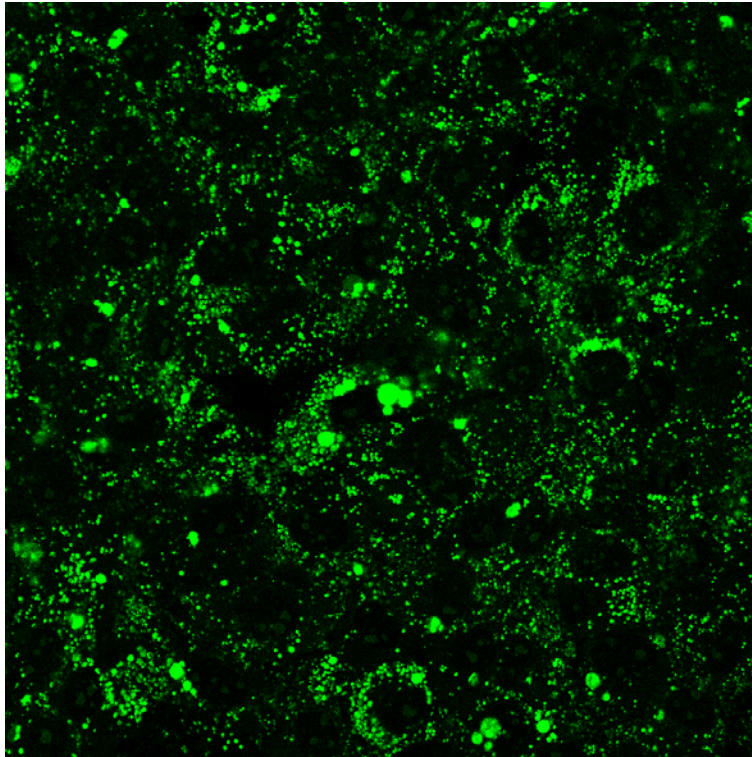


Abbildung 44 : Intrazelluläre Fluoreszenz von Phenac ( Beladungskonzentration 2.00  $\mu\text{M}$ , HBSS 37°C,  $\lambda_{\text{exc.}} = 514 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em.}} \geq 560 \text{ nm}$ )

In Abbildung 44 ist die selektive Akkumulation der Sonde auch bei einer sehr hohen Konzentration von 2.00  $\mu\text{M}$  dargestellt. Die mittlere Konzentration der Sonde in den Lysosomen und Endosomen wurde an zwei verschiedenen Tagen anhand von 3 Messungen bestimmt.

1 Messung [ $\mu\text{M}$ ]	2 Messung [ $\mu\text{M}$ ]	3 Messung [ $\mu\text{M}$ ]	Mittelwert [ $\mu\text{M}$ ]
130	160	103	131 $\pm$ 29

Tabelle 8: Intralysosomale Konzentration von Phenac ( 0.50  $\mu\text{M}$  Beladungskonzentration, HBSS, 37°C)

Die mittlere Konzentration von Phenac, bei einer Beladungskonzentration von 0.50  $\mu\text{M}$  in HBSS, liegt bei 131 $\pm$ 29  $\mu\text{M}$  in den sauren Kompartimenten,.

## 5.2.2 BDA      2,6-bis-[N-(2-dimethyl-ethyl)-propionamid]-8-(2,2'-bipyridyl)-4,4'-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bor-3a,4a-diaza-s-indacen (61)

### 5.2.2.1 Lokalisation in den Lysosomen

Zur Bestimmung der Lokalisation wurden Endothelzellen verwandt, da sie etwa 10 mal mehr Lysosomen enthalten als Hepatozyten. Die Zellen wurden mit je 1.00  $\mu\text{M}$  Phenac und Lyso-Tracker red beladen ( HBSS, 37°C)

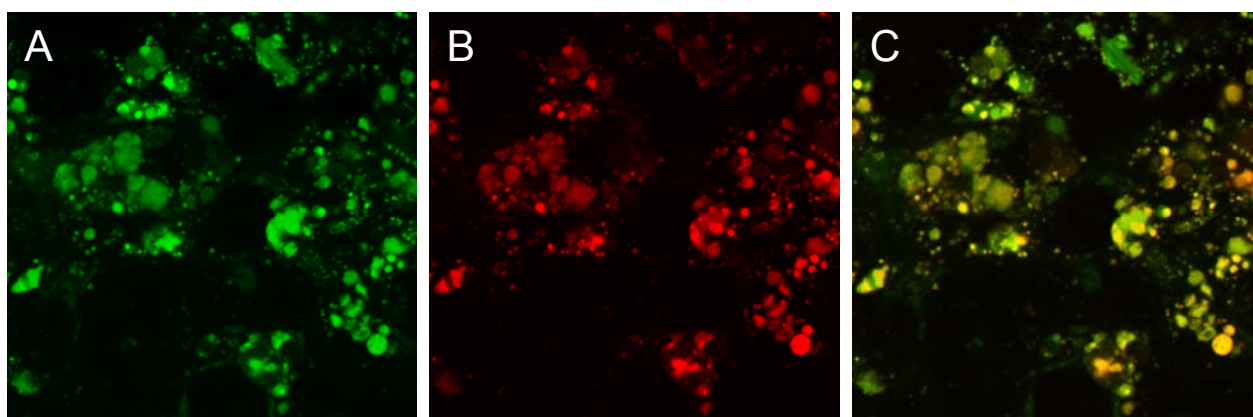


Abbildung 45 : Selektive intralysosomale Lokalisation von BDA in Endothelzellen. **(A)** Intrazelluläre Verteilung der Sonde BDA (  $\lambda_{\text{exc}}$ = 514nm,  $\lambda_{\text{em}}$ = 530 - 600 nm, 1.00  $\mu\text{M}$  Beladungskonzentration, HBSS, 37°C). **(B)** intrazelluläre Verteilung von „Lyso-Tracker red“ ( $\lambda_{\text{exc}}$ = 543 nm,  $\lambda_{\text{em}}$   $\geq$  560 nm, 1.00 $\mu\text{M}$  Beladungskonzentration, HBSS, 37°C). **(C)** Überlagerung der Bilder **(A)** und **(B)**.

In Bild A ist die grüne Fluoreszenz der Sonde BDA zu sehen, die rote Fluoreszenz der Tracker Substanz ist in Bild B abgebildet. Die Überlagerung der Bilder A und B ergibt Bild C. Man erkennt, dass die dargestellte Sonde BDA in den gleichen Organellen wie der Tracker akkumuliert. Die Akkumulation in den Lysosomen und Endosomen ist somit für BDA nachgewiesen.

Die Akkumulation in diesen Organellen konnte auch in anderen Zelltypen nachgewiesen werden. In der nachfolgenden Abbildung ist die intrazelluläre Fluoreszenz in Endothelzellen (Bild A), Hepatozyten (Bild B) und Fibroblasten (Bild C) abgebildet.

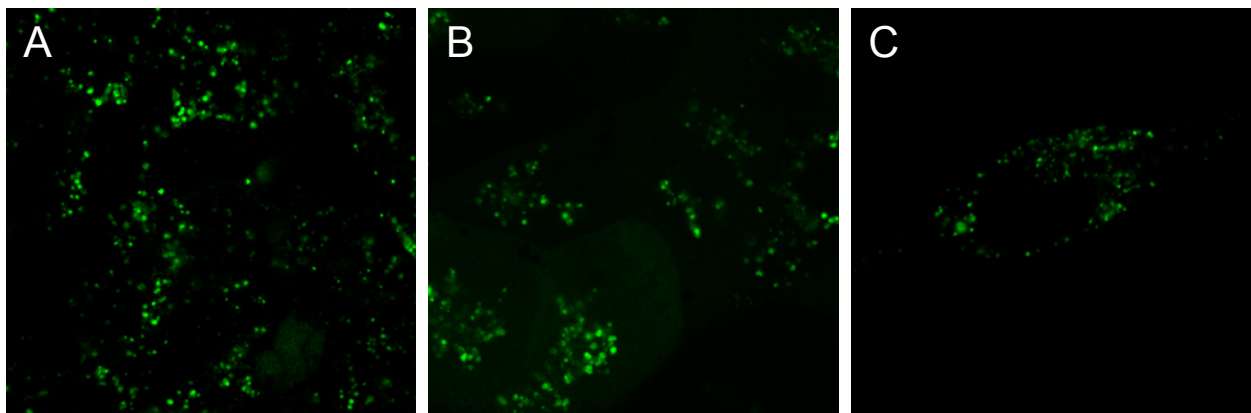


Abbildung 46 : Intrazelluläre Fluoreszenz der Fluoreszenzsonde BDA (1.00  $\mu\text{M}$  Beladungskonzentration, HBSS, 37°C,  $\lambda_{\text{ec}} = 514 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{emm.}} \geq 560 \text{ nm}$ ), **(A)** Lokalisation in den Lysosomen / Endosomen in Leberendothelzellen **(B)** in Leberhepatozythen und **(C)** in Fibroblasten

### 5.2.2.2 Konzentrationsbestimmung in den Lysosomen

Die Konzentration der Fluoreszenzsonde BDA in den sauren Kompartimenten der Zelle wurde anhand einer Kalibrierungsgeraden bestimmt. An drei verschiedenen Tagen wurden Endothelzellen mit 1.00  $\mu\text{M}$  Fluoreszenzsonde beladen und die Konzentration in den Lysosomen/ Endosomen bestimmt. Es ergab sich folgende Konzentration von BDA

1. Messung [ $\mu\text{M}$ ]	2. Messung [ $\mu\text{M}$ ]	3. Messung [ $\mu\text{M}$ ]	Mittelwert [ $\mu\text{M}$ ]
61.5	54.5	66	$61 \pm 15$

Tabelle 9: Konzentration von BDA, 1.00  $\mu\text{M}$  Beladungskonzentration in den Lysosomen und Endosomen

Es ergibt sich somit eine mittlere Konzentration von  $61 \pm 15 \mu\text{M}$  in den sauren Kompartimenten der Zelle.

### 5.2.2.3 Löschung / Entquenchung der Fluoreszenz in den Lysosomen

Nachdem die spezifische Lokalisation der Sonde nachgewiesen worden war, sollte nun der Beweis erbracht werden, dass die Fluoreszenzsonde BDA in den Organellen auf einen experimentell erhöhten chelatisierbaren Eisenpool mit Löschung ihrer Fluoreszenz

reagiert. Außerdem sollte die Löschung durch Zugabe eines membrangängigen Fe(II)-Chelators im Überschuss wieder aufgehoben werden.

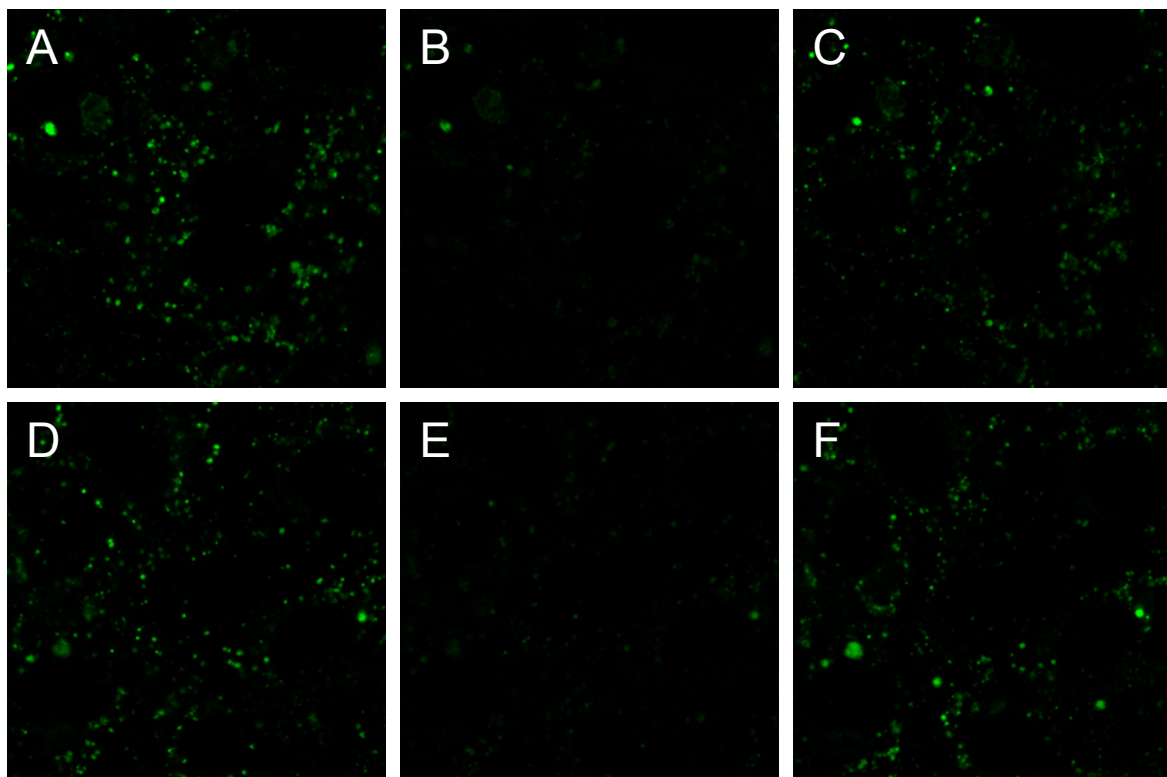


Abbildung 47 : **(A, D)** Intrazelluläre Fluoreszenz der Fluoreszenzsonde BDA in Endothelzellen (1.00  $\mu\text{M}$  Beladungskonzentration, HBSS, 37°C,  $\lambda_{\text{exc.}} = 514 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{emm.}} \geq 560 \text{ nm}$ ). **(B, E)** 5 Minuten nach Zugabe eines  $\text{Fe}^{3+}$ /8-Hydroxychinolin-Komplex (5.00  $\mu\text{M}$ ), **(C)** 60 Minuten nach Zugabe des Chelators Desferal (10 mM), **(F)** 60 Minuten nach Zugabe des Chelators 2,2'-Dipyridin (5 mM).

In Abbildung 47 ist die intrazelluläre Fluoreszenz der Sonde BDA in den Bildern A und D zu erkennen. Die Bilder B und E sind 5 Minuten nach Zugabe eines  $\text{Fe}^{3+}$ /8-Hydroxychinolin-Komplex entstanden. Die Fluoreszenz der Sonde ist in beiden Fällen weitgehend gelöscht worden. Bild C zeigt den Anstieg der Fluoreszenz 60 Minuten nach Zugabe von Desferal im Überschuss. Die gleichen Auswirkungen hat die Zugabe eines Überschusses von 2,2'-Dipyridin. Bild F ist 60 Minuten nach Zugabe dieses Chelators aufgenommen worden. Die Bilder beweisen, daß beide Chelatoren in der Lage sind, das von der Sonde gebundene Eisen zu entfernen und somit die Fluoreszenzlöschung rückgängig zu machen.

Im Anschluß sollte der chelatisierbare Eisenpool in den Lysosomen / Endosomen quantifiziert werden. Dazu wurden Endothelzellen mit der Fluoreszenzsonde beladen und Desferal im Überschuss hinzugegeben.

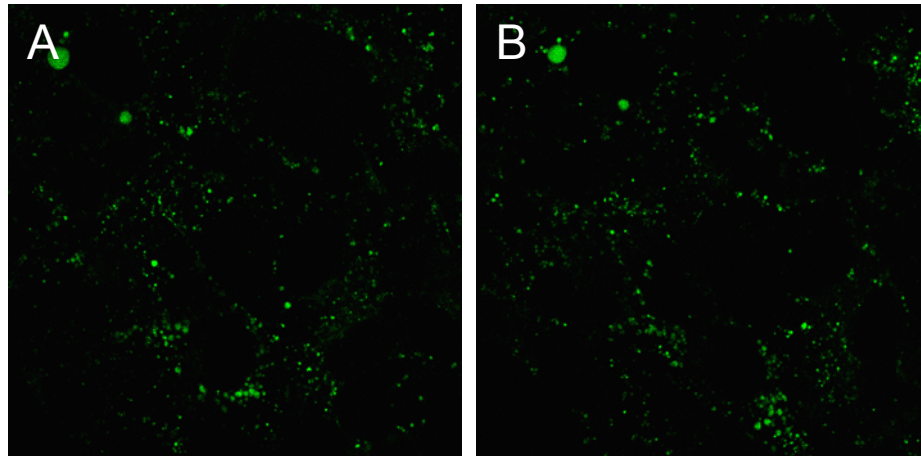
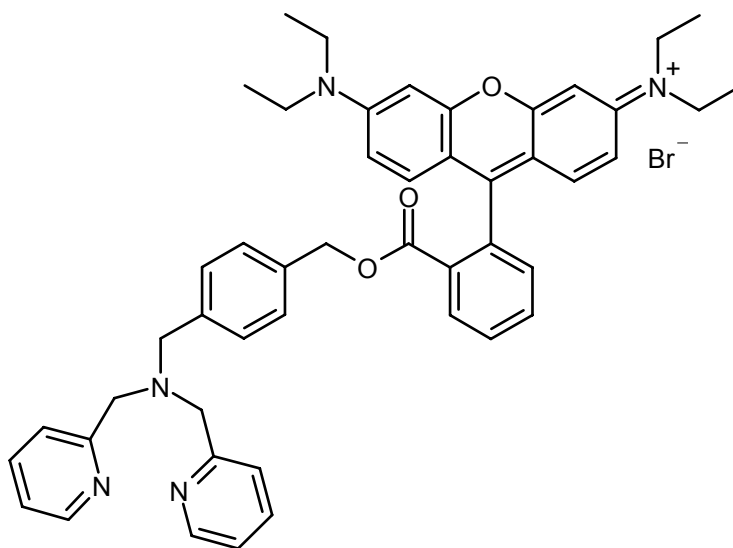


Abbildung 48: Intrazelluläre Fluoreszenz von BDA (0.50  $\mu\text{M}$  Beladungskonzentration, HBSS, 37°C,  $\lambda_{\text{exc.}} = 514 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{emm.}} \geq 560 \text{ nm}$ ), (A) vor Zugabe von Desferal, (B) 120 min. nach Zugabe von Desferal (5 mM)

Abbildung 48 zeigt die intralysosomale Fluoreszenz der Fluoreszenzsonde BDA in Endothelzellen. Bild A wurde vor der Zugabe von Desferal aufgenommen, Bild B ist 120 Minuten nach Zugabe von 5 mM Desferal aufgenommen worden. Es ist kein Anstieg der Fluoreszenzintensität zu beobachten. Man kann lediglich eine geringe Umverteilung der Organellen beobachten, was aber mit einer Inkubationszeit von 120 Minuten erklärt werden kann, da sich die Organellen in der Zelle bewegen können. Der nicht erfolgte Fluoreszenzanstieg zeigt, dass in den sauren Organellen kein chelatisierbarer Eisenpool vorhanden ist.

## 6 Zusammenfassung

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung einer Fluoreszenzsonde zur Charakterisierung des chelatisierbaren Eisenpools in den Mitochondrien vitaler Zellen. Das Spektrum der bereits entwickelten Sonden RDA und RPA sollte um eine Sonde erweitert werden, welche eine schwächere Komplexbildungskonstante als die erwähnten Sonden besitzt. Die dargestellte Sonde Rhodamin B-4-[bis(pyridin-2-ylmethyl)aminocarbonyl] benzylester „PIRO“ (**13**) besitzt als Chelator N,N-Bis(pyridin-2-ylmethyl)amin mit einer Komplexbildungskonstanten des freien Liganden von  $\log \beta_2 = 12.2$  und somit eine wesentlich geringere Bindungsaffinität zu Fe(II) als die Sonden RDA ( $\log \beta_3 = 17.4$ ) und RPA ( $\log \beta_3 = 21.3$ ).



PIRO (**13**)

Die Messungen im chemischen System zeigten, dass die Sonde eine für Rhodamin-Derivate typische Fluoreszenz im längerwelligen Bereich aufweist. Diese Fluoreszenz wurde durch Zugabe von Fe(II) zum Teil gelöscht. Die Tatsache, dass die Fluoreszenz der Sonde nicht in einem stöchiometrischen Verhältnis durch Fe(II) gelöscht wird, kann mit der niedrigen Komplexbildungskonstante des vorhandenen Chelators erklärt werden. Die Konkurrenz zu den für eine stabile Fe(II)-Lösung benötigten Reduktionsmitteln, wie



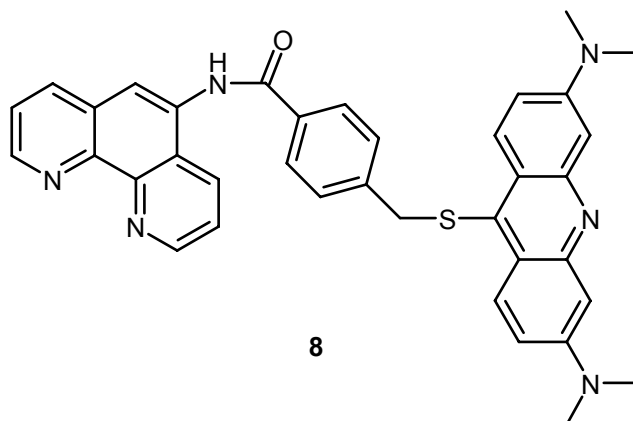
Ascorbat ist bei der vorhandenen Komplexbildungskonstanten sehr groß, zumal die Reduktionsmittel in einem großen Überschuss vorliegen.

Eine weitere Voraussetzung, um die Menge an chelatisierbaren Fe(II) quantifizieren zu können, ist die lineare Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Konzentration der Sonde. Diese lineare Abhängigkeit konnte in den durchgeführten Messungen für den relevanten Konzentrationsbereich bestätigt werden. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die nötige pH-insensitive Fluoreszenz der Sonde gegeben war. Der Einfluss anderer Übergangsmetallionen wurde ebenfalls untersucht. Es zeigte sich dass die Fluoreszenz der Sonde lediglich durch Fe(II), Co(II) und Cu(II) teilweise gelöscht werden konnte. Da Co(II) und Cu(II) intrazellulär in keinen relevanten Konzentrationen vorliegen, kann ihr Einfluss auf die Indikatorfluoreszenz vernachlässigt werden.

In den nachfolgenden zellulären Messungen konnte sowohl eine selektive Akkumulation in den Mitochondrien von Hepatozyten als auch eine starke Reaktion auf die experimentelle Erhöhung des chelatisierbaren Eisenpools beobachtet werden. Die Messungen nach Zugabe des Chelators PIH im Überschuss zeigten, dass die Sonde PIRO nur sehr wenig Fe(II) aus dem chelatisierbaren Eisenpool der Mitochondrien an sich binden konnte, da die Fluoreszenzintensität der Sonde nur in einem sehr geringen Maße anstieg. Aus verschiedenen Versuchen ergab sich ein experimentell ermittelter Wert von  $1.4 \pm 1.2 \mu\text{M Fe(II)}$ , der von der Sonde erfasst werden konnte. Anhand der ermittelten Daten kann die mittlere Bindungsaffinität von Fe(II) im chelatisierbaren Eisenpool von Mitochondrien auf einen Bereich von  $\log \beta_2 = 12.2$  und  $\log \beta_3 = 17.4$  festgelegt werden.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte ein Referenzfarbstoff, die sogenannte „grüne Kontrolle“, synthetisiert werden. Dieser Farbstoff sollte dazu dienen, eventuelle Einflüsse wie pH-Wert, Temperatur und Umgebung auf das Verhalten der Fluoreszenzsonden RPA, RDA und PIRO zu erkennen. Die Darstellung der gewünschten Verbindung gelang jedoch nicht.

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war die Reinigung der in der Diplomarbeit dargestellten Fluoreszenzsonde 4[[3,6-bis(dimethylamino)acridin-9-yl]thio]methyl}-N-(1,10-phenanthrolin-5-yl)benzamid „PHENAC“ (**8**), sowie die Vermessung im chemischen und zellulären System.

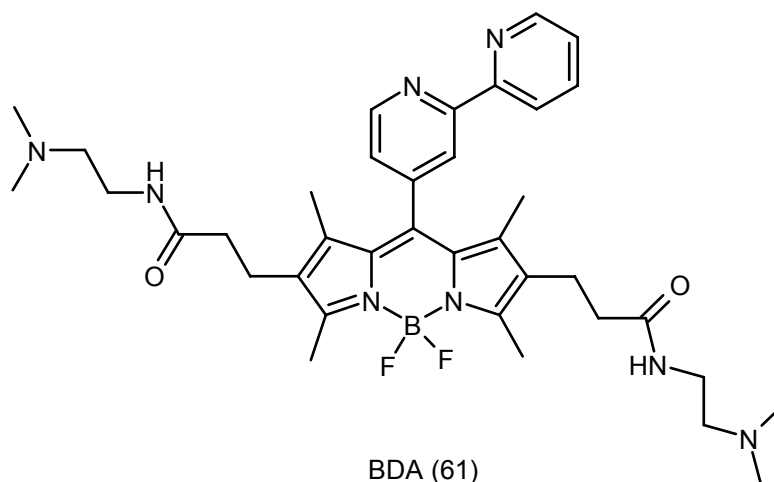


Die Reinigung der Sonde gelang mittels mehrfacher Säulenchromatographie. Nachfolgende Messungen im chemischen System zeigten, dass die Sonde eine lineare Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der gegebenen Konzentration zeigt. Die notwendige stöchiometrische Löschung der Fluoreszenz durch Fe(II)-Zugabe wurde ebenfalls erfüllt. Die Sonde besitzt eine pH-sensitive Fluoreszenz, welche durch die in Konjugation zum fluorophoren System stehenden Dimethylaminogruppen erklärt werden kann. Bei niedrigen pH-Werten werden diese protoniert und verändern so die Fluoreszenzintensität der Sonde.

Die Messungen im zellulären System zeigten die selektive Akkumulation der Fluoreszenzsonde **8** in den sauren Kompartimenten, den Lysosomen und Endosomen, der Zelle. Diese Anreicherung der Sonde wird durch die vorhandenen Dimethylaminogruppen erreicht. Wie bereits aus den vorangegangenen Messungen bekannt, werden diese Gruppen im sauren pH-Bereich protoniert. Durch die Bildung einer lokalisierten positiven Ladung, verliert die Verbindung ihre Membrangängigkeit und reichert sich in den Kompartimenten an. Zur Quantifizierung des chelatisierbaren Eisenpools in den Lysosomen / Endosomen der Zelle ist die Sonde Phenac (**8**) aufgrund ihrer pH-sensitiven Fluoreszenzintensität nicht geeignet, da durch Zugabe beispielsweise eines zweiten Chelators der pH-Wert der Zelle verändert werden kann. Die Änderung des pH-Wertes hätte ein verändertes Fluoreszenzverhalten der Sonde zur Folge, so dass der eventuell beobachtete Fluoreszenzanstieg nicht eindeutig auf die Anwesenheit von Fe(II) zurückgeführt werden könnte.

Der vierte Teil dieser Arbeit baute auf den vorangegangenen Ergebnissen auf. Es sollte eine Fluoreszenzsonde zur Quantifizierung des chelatisierbaren Eisenpools in den

Lysosomen/Endosomen entwickelt werden, welche eine pH-insensitive Fluoreszenz besitzt, aber dennoch Dimethylaminogruppen als Zielsteuerungskomponente besitzt. Die entwickelte Sonde 2,6-Bis-[N-(2-dimethyl-ethyl)-propionamid]-8-(2,2'-bipyridyl)-4,4'-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bor-3a,4a-diaza-s-indacen „BDA“ (**61**) sollte alle an eine solche Sonde gestellten Forderungen erfüllen.



Die Messungen im chemischen System zeigten, dass die Sonde mit einer hohen Fluoreszenzquantenausbeute und einem Anregungsmaximum von 524 nm ein Fluoreszenzmaximum von 547 nm besitzt, welches in Lage und Intensität nicht vom herrschenden pH-Wert anhängig ist. Auch die für die Quantifizierung des chelatisierbaren Eisenpools notwendige lineare Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Konzentration der Sonde war gegeben. Die erforderliche stöchiometrische Löschung der Fluoreszenzintensität bei Zugabe einer Fe(II)-Lösung konnte ebenfalls nachgewiesen werden. Der Einfluss anderer Übergangsmetallionen auf das Fluoreszenzverhalten der Sonde, zeigte dass nur die Kationen Cu(II), Cu(I) Co(II) und Fe(II) einen Einfluss besitzen. Da diese Ionen bis auf Fe(II) im zellulären Umfeld nur in sehr geringen Konzentrationen vorliegen, kann ihr Einfluss auf das Fluoreszenzverhalten der Sonde vernachlässigt werden.

Die Messungen im zellulären System ergaben eine sehr selektive Akkumulation der Sonde in den Lysosomen/Endosomen von Endothelzellen, Hepatozyten und Fibroblasten. Die experimentelle Erhöhung bzw. Erniedrigung der intrazellulären Eisenkonzentration hatte einen Fluoreszenzabfall bzw. Fluoreszenzanstieg zur Folge.

Die vorangegangenen Ergebnisse zeigen, dass die Sonde in der Lage ist, den chelatisierbaren Eisenpool in den sauren Kompartimenten der Zelle zu quantifizieren.

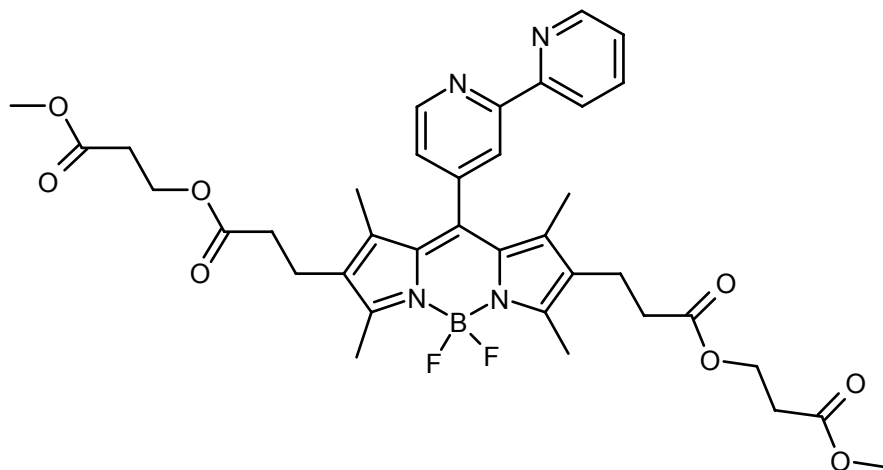
Daher wurden Endothelzellen mit der Fluoreszenzsonde beladen und im Anschluss wurde ein zweiter Chelator im Überschuss hinzugegeben. Es konnte jedoch kein Anstieg der Fluoreszenzintensität beobachtet werden. Die Ergebnisse zeigen, dass innerhalb der messtechnischen Fehlergrenze von  $\pm 2.00 \mu\text{M}$  kein chelatisierbares Eisen in den Lysosomen/Endosomen vorhanden ist.

## 7 Ausblick

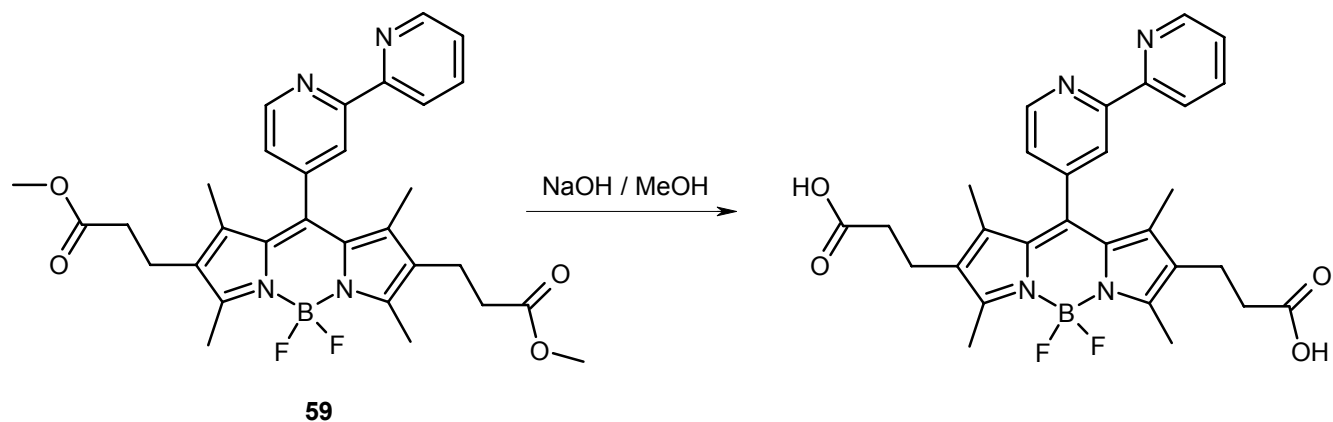
Die in der Literatur beschriebene Protektivität von Desferal oder auch HMM-Desferal (*high molecular mass desferal*) kann nicht auf die Chelatisierung des Fe(II) in den Lysosomen und Endosomen zurückgeführt werden, da die Messungen mit der dargestellten Sonde BDA gezeigt haben, dass ein solcher Pool zumindest in relevanten Konzentrationen nicht existiert. Dass Desferal, in beiden Formen, die Zelle vor eisenvermittelter Schädigung schützt, kann aber auch bedeuten, dass das durch diesen Chelator gebundene Eisen im Cytosol der Zelle vorliegt.

Der chelatisierbare Eisenpool im Cytosol der Zelle konnte bereits quantifiziert werden<sup>[119]</sup>. Die Sonde PhenGreen SK weist jedoch keine selektive Akkumulation im Cytosol auf, so dass die Quantifizierung und die Entwicklung des Eisenpools aufgrund von Veränderungen, z.B. Erhöhung des oxidativen Stresses, nur bedingt möglich ist. Ein weiteres Ziel sollte daher sein eine selektive Fluoreszenzsonde für den chelatisierbaren Eisenpool im Cytosol zu entwickeln.

Die Zielsteuerungskomponente für das Cytosol wäre ein Acetoxymethylester, da dieser durch die im Cytosol vorhandenen Esterasen gespalten werden kann und so keine Membrangängigkeit mehr besitzt. Die nachfolgend dargestellte Struktur könnte die Anforderungen, welche an eine Sonde gestellt werden, erfüllen.



Der Grundkörper besteht analog zur entwickelten Fluoreszenzsonde BDA aus einem BODIPY-Derivat in Verbindung mit dem Chelator 2,2'-Dipyridin. Die Einführung der Acetoxymethylester-Gruppen als Zielsteuerungskomponente sollte aus synthetischer Sicht durchführbar sein. Die Synthese könnte wie folgt verlaufen.



Das bereits erfolgreich synthetisierte BODIPY-Derivat BPE (**59**) könnte mit NaOH zur Säure umgesetzt werden<sup>[96]</sup>. Die nachfolgende Umsetzung mit äquimolaren Mengen NaH und Chlormethylacetat sollte den gewünschten Acetoxymethylester liefern. Mit Hilfe dieser Verbindung sollte es möglich sein, den chelatisierbaren Eisenpool im Cytosol besser zu charakterisieren.

## 8 Experimenteller Teil

### 8.1 Instrumentelle Analytik

#### Fluoreszenzspektren

Die Fluoreszenzspektren wurden mit Hilfe des Gerätes Fluoroscans FL 3095 der Firma J&M (Aalen, Deutschland) erhalten.

#### Kernresonanzspektren

$^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Kernresonanz-Spektren wurden mit den Geräten Gemini XL 200 der Firma Varian (200 MHz/50 MHz) (Darmstadt, Deutschland) bzw. DRX-500 der Firma Bruker (500 MHz/125 MHz) (Rheinstetten, Deutschland) aufgenommen. Zweidimensionale Spektren (gs-COSY 90, gs-HMBC, gs-HMQC) wurden ausschließlich mit dem Spektrometer DRX-500 erhalten. Die Angabe der chemischen Verschiebungen erfolgt in der Einheit ppm. Als interner Standard dienten jeweils die undeuterten Anteile der verwendeten deuterierten Lösungsmittel. Neben den konventionellen  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren wurden DEPT 135- sowie DEPT 90-Aufnahmen zur Produktcharakterisierung verwendet.

#### IR-Spektren

Die Aufnahme der Infrarot-Spektren erfolgte mit dem FT-IR-Spektrometer FTS 135 der Firma Bio-Rad (Cambridge, USA). Die Spektren wurden als KBr-Verreibung gemessen.

#### Fluoreszenzspektren

Die Fluoreszenzspektren wurden mit Hilfe des Gerätes Fluoroscans FL 3095 der Firma J&M (Aalen, Deutschland) erhalten.

#### Intrazelluläre Fluoreszenzmessungen

Die intrazellulären Fluoreszenzmessungen wurden mit einem Laser-Scanning-Mikroskop (inverses Mikroskop Axiovert 100 M mit LSM 510 Laser-Scanning-Modul der

Firma Zeiss, Oberkochen, Deutschland) durchgeführt. Das Gerät ist mit einem Argon- und einem Helium/Neon-Laser ausgerüstet. Der Argon-Laser mit 6.75 mW (= 45 % der Maximalleistung) Ausgangsleistung wurde zur Anregung bei einer Wellenlänge von  $\lambda_{\text{exc.}} = 488 \text{ nm}$  verwendet. Der Helium/Neon-Laser mit 1 mW (= Maximalleistung) Ausgangsleistung wurde für die Anregung bei  $\lambda_{\text{exc.}} = 543 \text{ nm}$  genutzt. Als Objektive mit numerischer Apertur wurden das 63x NA 1.40 Plan- Apochromat/Oil bzw. das 20x LD-Achroplan 0.4 Ph2 der Firma Zeiss eingesetzt. Als Emissionsfilter dienten Longpassfilter mit  $\lambda_{\text{em.}} \geq 585 \text{ nm}$  oder  $\lambda_{\text{em.}} \geq 560 \text{ nm}$  sowie ein Filter mit  $\lambda_{\text{em.}} \geq 505 - 530 \text{ nm}$ . Die Temperierung der für die Messungen verwendeten Pentz-Kammern (hergestellt in der Werkstatt der Institutsgruppe I des Universitätsklinikums Essen) erfolgte durch einen elektrisch heizbaren Mikroskoptisch (Zeiss) bzw. durch einen flüssigkeitsgekühlten Mikroskoptisch, der mit einem Kryostaten (Thermomix BM, B. Braun Biotech International, Melsungen, Deutschland) verbunden war. Alle Messungen wurden im „Expert Mode“ der LSM 510-Software durchgeführt. Für qualitative und quantitative Fluoreszenzmessungen wurden die verschiedenen Parameter (Laserleistung, Detector Gain, Pinhole, Scan Time, Amplifying Gain, Auflösung, Numbers of Scan) stets so variiert, dass eine optimale Messung innerhalb des Detektormessbereiches möglich war. Für alle vergleichenden Messungen wurden identische Geräteeinstellungen verwendet. Zur Auswertung der Fluoreszenzmessungen wurde die Software „physiology evaluation“ des LSM 510-Systems genutzt. Die Messbereiche (regions of interest, ROI) wurden für jeden Messzeitpunkt manuell repositioniert und somit Objektbewegungen bzw. -veränderungen im Verlauf der Messung berücksichtigt. Zur Bestimmung von Zeitverläufen wurde außerdem ein digitales Fluoreszenzmikroskopsystem (inverses Mikroskop Axiovert 135 TV der Firma Zeiss, gekoppelt mit dem bildgebenden Attofluor System, Atto Instruments, Rockville, MD, USA) verwendet. Die auch in diesem Fall eingesetzten Pentz-Messkammern können gleichfalls durch den Mikroskoptisch temperiert werden. Die Anregung der intrazellulären Indikatoren erfolgte in vorgegebenen Zeitintervallen durch eine Quecksilberdampfhochdrucklampe mit vorgeschalteter Verschlussblende (Shutter) unter Verwendung eines Anregungsfilters mit  $\lambda_{\text{exc.}} \geq 535 \pm 17 \text{ nm}$ , eines Emissionsfilters von  $\lambda_{\text{em.}} \geq 590 \text{ nm}$  und des Strahlenteilers FT580. Eine digitale Kamera detektierte das passierende Fluoreszenzlicht, digitalisierte



es und projizierte es bei Bedarf einen Monitor. Nach der Wahl eines repräsentativen Gesichtsfeldes, konnte am Monitor des Attofluor-Systems für jede Zelle ein definierter Messbereich (ROI) ausgewählt werden. Die Verstärkereinstellung wurde auch für dieses Mikroskop-System stets so gewählt, dass die Intensität der intrazellulären Fluoreszenz sowohl unter Ausgangsbedingungen als auch nach entsprechender Einflussnahme innerhalb des Detektorbereiches lag.

#### Massenspektren

Die Aufnahme der Massenspektren erfolgte mit dem Gerät Bio TOF II der Firma Bruker (ESI - Elektrospray Ionisation) (Boston, USA). Zur Auswertung der hochaufgelösten Massenspektren wurde das Signal des Isotopenmusters mit der geringsten Masse (monoisotopic mass) ausgewählt.

#### pH-Werte

Die angegebenen pH-Werte wurden mit dem pH-Meter 765 Calimatic der Firma Knick (Berlin, Deutschland) ermittelt.

#### Schmelzpunkt

Die Schmelzpunktbestimmung erfolgte mit dem Gerät 510 der Firma Büchi (Flawil, Schweiz) oder unter Verwendung eines Mikroskop-Heiztisches (Reichert Thermovar, Wien, Österreich). Die Werte sind unkorrigiert angegeben.

#### UV/Vis-Spektren

Für die Ultraviolett/Visuell-spektroskopischen Messungen standen ein Cary 219 der Firma Varian (Darmstadt, Deutschland) bzw. das Gerät Spectralys der Firma J&M (Aalen, Deutschland) zur Verfügung.

## 8.2 Trocknung der Lösungsmittel

Ethanol wurde pro Liter mit 7.00 g Natrium und mit 27.5 g Phthalsäurediethylester versetzt und zwei Stunden unter Rückfluß erwärmt und abdestilliert.

Dichlormethan wurde mit Molekularsieb versetzt und auf trockenes Molekularsieb abdestilliert.

Tetrahydrofuran wurde mit Natrium unter Rückfluß erhitzt, bis der zugegebene Indikator Benzophenon durch eine Blaufärbung die Abwesenheit von Wasser anzeigte.

Acetonitril wurde über Calciumhydrid 12 Stunden unter Rückfluß erhitzt und im Anschluß vom Trocknungsmittel abdestilliert.

Alle verwendeten Lösungsmittel wurden über Molekularsieb und unter Schutzgas aufbewahrt.

## 8.3 verwendete Chemikalien zur Synthese

Palladium (10% auf Aktivkohle), Phosphortribromid, Schwefel, 4-Brommethylbezoesäure, Natriumhydrogencarbonat, Aluminiumoxid<sub>neutral</sub> (zur Chromatographie), Aluminiumoxid<sub>basisch</sub> (zur Chromatographie), Phenanthren, Hydrazin-Monohydrat, Natriumhydroxid, Natriumborhydrid, Kaliumcarbonat, Celite, Triethylamin, Natrium, Natriumsulfat, Lithiumchlorid, Tetrakis(triphenylphosphan)-palladium wurden von der Firma Fluka bezogen.

Acridin-Orange, 1,10-Phenanthrolin-Monohydrat, Rhodamin B Base, Dimethylformamid,  $\alpha,\alpha'$ -Dibrom-p-xylol, Butyllithium-Lösung (2,5M in Hexan), 2-Brompyridin, Acetonitril, 2,3-Dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinon, Dimethylsulfoxid, Pyridin, 2-Hydroxy-4-methylpyridin, Trifluormethansulfonsäureanhydrid, Selendioxid, Aceton von der Firma

Acros-Organics. Wasserstoffperoxid (30%  $\text{H}_2\text{O}_2$ ), Eisessig, Essigsäureanhydrid, Dicyclohexylcarbodiimid, Phosphopentoxid, 2,4-Dimethyl-3-ethylpyrrol, Bortrifluorid-diethyletherat, Methyl-5-(benzoxycarbonyl)-2,4-dimethyl-3-pyrrolpropionat, Dioxan Trimethylzinnchlorid von Aldrich. Bis(triphenylphosphan)palladium (II)-chlorid (15.2% Pd), Xylol, N,N-Dimethylethylendiamin von Merck. Methyl-6-chlornicotinat von Lancaster. Toluol, Diethylether von Fisher Scientific. Salpetersäure (70%), Florisil, Trifluoressigsäure, Kieselgel von Roth. Dichlormethan von J. T. Baker. Magnesiumsulfat, Salzsäure von Riedel de Häen. Ethylendiamintetraessigsäure von Sigma-Aldrich. Chloroform, Hexan, Ethanol, Methanol, Natriumchlorid von VWR.

## 8.4 Chemikalien für zelluläre Messungen

Leibovitz L-15 Medium und RPMI 1640-Medium wurden erhalten von der Firma Gibco (Eggenstein, Deutschland), Penizillin/Streptomycin von PAA Laboratories (Linz, Österreich), Fibronectin von Roche Molecular Biochemicals (Mannheim, Deutschland), Kollagen (Typ R), Dexamethason, Rinderserumalbumin und Gentamicin von Serva (Heidelberg, Deutschland). Dimethylsulfoxid (DMSO) und Trinatriumcitrat Dihydrat wurden von der Firma Merck (Darmstadt, Deutschland), Natriumdodecylsulfat (SDS), fötales Kälberserum, Eisen(II)ammoniumsulfat Hexa-hydrat,  $\text{FeCl}_3$ , 8-Hydroxychinolin, L-Glutamin, Kollagenase, Tris-(hydroxymethyl)aminomethan (Tris) und Propidiumiodid von Sigma (Taufkirchen, Deutschland), Chelex 100 (Polystyrol-divinylbenzol-iminodiacetat), Glukose, Glutathion und Ascorbinsäure von Sigma-Aldrich sowie die Metallsalze  $\text{MnCl}_2$ ,  $\text{NiSO}_4$ ,  $\text{CuCl}_2$ ,  $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{CuCl}$  von Aldrich erhalten. Der Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin 123 wurden bei Molecular Probes Europa BV beschafft. Pyridoxalisonicotinoylhydrazon wurde dankenswerterweise von Prof. Dr. P. Ponka (Lady Davis Institute for Medical Research, Montreal, Kanada) überlassen. Falcon Zellkulturflaschen und Falcon 6-well Zellkulturschalen wurden von der Firma Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland), Eppendorf-Cups von Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland) und Glas-Deckplättchen von Assistent (Sondheim/Röhn, Deutschland) bezogen.

## 8.5 Untersuchungen im chemischen System

### 8.5.1 verwendete Medien und Lösungen

Die verwendeten Puffer und Medien wurden mit Hilfe des Komplexbildnerharzes Chelex 100 von Schwermetallen befreit.

Die verwendeten Puffer wurden mit bidestillierten Wasser angesetzt und mindestens 8 Stunden bei 4° C mit Chelex behandelt (1 g pro 100 mL Lösung). Das Harz wurde erst kurz vor der Messung abdekantiert und der pH-Wert erneut mit Hilfe von 2.00 M - Lösungen NaOH und HCl eingestellt.

Für den verwendeten Tris/HCl-Puffer wurde eine 10 mM Lösung von Tris-(hydroxymethyl)aminomethan in bidest. Wasser hergestellt und mit 1.00 M HCl-Lösung auf einen pH-Wert von 8.2 eingestellt.

Für den Acetat-Puffer wurden 5.90 g (0.072 mol) Natriumacetat in 100 mL bidest. Wasser gelöst und mit etwa 100 mL einer 0.5 M Essigsäure auf einen pH von 4.5 eingestellt.

Das Medium zur Simulation der mitochondrialen Matrix (pH = 8.2) bestand aus einer Lösung von 30.0 mM KCl, 6.00 mM MgCl<sub>2</sub>, 4.00 mM K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O, 1.10 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.00 mM NaCl, 6.85 mM Glukose, 0.23 mM Trinatriumcitrat Dihydrat, 6.00 mM ATP 6.00 mM NADPH, 4.00 mM NADH, 10.0 mM Glutathion, 1.00 mM Ascorbinsäure, 1.75 M Saccharose, 0.18 % w/v SDS, 10.0 mM Tris/HCl in bidestillierten von Schwermetallen befreiten Wasser.

Die verwendete Fe<sup>2+</sup>-Lösung wurde wie im folgenden beschrieben angesetzt.

29.4 mg Natriumcitrat und 39.2 mg Mohrsches Salz wurden in 10 mL bidest. Wasser gelöst (10 mM). Von dieser Lösung wurden 100 µL zu einer Lösung aus 3.52 mg Ascorbinsäure in 900 µL Wasser gegeben, um eine Endkonzentration von 1 mM Fe<sup>2+</sup> zu

erhalten. Die Lösung sollte mindestens 20 Minuten inkubieren. Sie sollte nicht länger als 90 Minuten verwendet werden.

### 8.5.2 Untersuchung der Fluoreszenzsonden im chemischen System

Zur Aufnahme der Absorptions- und Fluoreszenzspektren der potentiellen Fluoreszenzindikatoren PIRO (**8**), Phenac (**13**) und BDA (**63**) im zellfreien System wurden zunächst Stammlösungen (1.00 mM) der Indikatoren in Dimethylsulfoxid angefertigt. Diese Lösungen wurden aliquotiert und konnten über mehrere Wochen unter Lichtausschluss bei einer Temperatur von - 30 °C gelagert werden. Aliquots dieser Stammlösungen wurden zur Herstellung unterschiedlich konzentrierten gepufferten, schwermetallfreien Indikatorlösungen verwendet. Dazu wurden die entsprechenden Puffer in der beschriebenen Weise von Schwermetallkontaminationen befreit, im Anschluss auf einen der pH-Wert von 4.5 bzw. 8.2 eingestellt und mit 0.18 / 0.19 % w/v SDS (Natriumdodecylsulfat), als Lösungsvermittler, versetzt. Für Fluoreszenzmessungen in Gegenwart von  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen wurde der vor Messbeginn eisenfreien Indikatorlösung vor pH-Wert-Einstellung zusätzlich Ascorbinsäure in einer Endkonzentration von 2.00 mM zugesetzt und nochmals über einen Zeitraum von zwei Stunden mit Chelex behandelt und erst danach erfolgten die pH-Wert-Einstellung sowie die Zugabe des Lösungsvermittlers. Die Indikatorlösungen wurden eisenfrei und nach sukzessiver Zugabe einer  $\text{Fe}^{2+}$ -Stammlösung am Fluoreszenzspektrometer Fluoroscans FL 3095 unter Verwendung von Quarzglas-küvetten ( $d = 1.00 \text{ cm}$ ) untersucht. Die Aufnahme der Emissionsspektren erfolgte stets durch Anregung im Absorptionsmaximum des jeweiligen Indikators. Alle Spektren wurden bei einer Temperatur von 22 °C aufgenommen.

Die Messungen der Löschung der Indikatorfluoreszenz bei Zugabe von  $\text{Fe}^{2+}$ -Lösung zur Bestimmung der Komplexstöchiometrie und die Bestimmung der Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Indikatorkonzentration wurden unter normoxischen Bedingungen in verschiedenen Medien, den Puffermedien (10.0 mM Tris/HCl, 2.00 mM Ascorbinsäure, 0.18 % w/v SDS, pH = 8.2, oder 72.0 mM Acetat-Puffer, 2.00 mM Ascorbinsäure, 0.19% w/v SDS, pH = 4.5) und dem der mitochondrialen Matrix

nachempfundenen Medium durchgeführt. Für Fluoreszenzmessungen am Laser-Scanning-Mikroskop wurden zunächst Aliquots der genannten Medien (1.00 mL) in temperierte (37 °C) Eppendorf-Cups überführt und durch Zugabe von Aliquots der Indikator-Stammlösungen (1.00 mM) Indikatorstandards mit unterschiedlichen Konzentrationen hergestellt. Dem Eppendorf-Cup wurden dann 100 µL der jeweiligen Indikatorlösung entnommen und auf ein Deckgläschen in einer temperierten (37 °C) Pentz-Kammer aufgebracht. Für jede Messung wurde ein neues bzw. ungebrauchtes Deckgläschen eingesetzt. Die Pentz-Kammer wurde auf dem beheizten Mikroskoptisch ausgerichtet und die Fluoreszenz der Lösungen innerhalb der Flüssigkeitssäule in einer Fokusebene von 10.0 µm über der Deckglasoberfläche unter Verwendung des Helium/Neon-Lasers ( $\lambda_{\text{exc}} = 543 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} \geq 560 \text{ nm}$ ) oder des Argon-Lasers ( $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} \geq 505 \text{ nm}$ ) sowie des Objektivs 63x NA 1.40 Plan-Apochromat gemessen. Die Indikatorlösungen wurden des weiteren mit definierten Konzentrationen der 1.00 mM  $\text{Fe}^{2+}$ -Stammlösung titriert und je 10 Minuten nach Zugabe der  $\text{Fe}^{2+}$ -Salzlösung die resultierende Fluoreszenz der Lösung in beschriebener Weise bestimmt.

### **8.5.3 Untersuchungen verschiedener Einflußfaktoren auf das Fluoreszenzverhalten**

Auch der Einfluss verschiedener biologisch relevanter Faktoren auf die Indikatorfluoreszenz und die Eisen-induzierte Fluoreszenzlöschung wurde am Laser-Scanning-Mikroskop bestimmt. Zunächst wurden dazu 1.00 mM Stammlösungen von  $\text{Fe}^{2+}$  ( $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$ /Trinatriumcitrat  $\cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  ( $\text{FeCl}_3$ ) sowie von  $\text{Mn}^{2+}$  ( $\text{MnCl}_2$ ),  $\text{Ni}^{2+}$  ( $\text{NiSO}_4$ ),  $\text{Cu}^{2+}$  ( $\text{CuCl}_2$ ),  $\text{Co}^{2+}$  ( $\text{CoCl}_2$ ) und  $\text{Zn}^{2+}$  ( $\text{ZnCl}_2$ ) in bidestilliertem Wasser bzw. eine 10.0 mM Stammlösung von  $\text{Cu}^+$  ( $\text{CuCl}$ ) in 1.00 M Salzsäure angefertigt. Diese Salzlösungen wurden in Endkonzentrationen von 20.0 µM zu 20.0 µM Lösungen der Indikatoren **13** und **63** im jeweiligen Puffersystem pipettiert und die Fluoreszenz der Lösungen mit Hilfe des Fluoreszenzspektrometers bestimmt. Fluoreszenzmessungen in Gegenwart von  $\text{Fe}^{3+}$ - und  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen wurden in Abwesenheit der Reduktionsmittel Glutathion und Ascorbinsäure vorgenommen.

Die pH-Abhängigkeit (im Bereich von pH = 2 - 10.0) der Indikatorfluoreszenz der Indikatoren **8**, **13**, **63** wurde mit einer 10.0  $\mu$ M Indikatorlösung (aus einer 1.00 mM DMSO Stammlösung) in Wasser unter Zusatz von = 0.18 bzw. 0.19% SDS gemessen. Der pH-Wert wurde mit 1.0 M Salzsäure und 1.0 M Natronlauge bei 37 °C eingestellt. Die Messungen der pH-Abhängigkeit fanden am Fluoreszenzspektrometer Fluoroscans FL 3095 unter Verwendung von Quarzglas-küvetten (d = 1.00 cm) statt.

## **8.6 Untersuchungen im zellulären System**

### **8.6.1 Verwendete Medien und Lösungen**

Das Wasch- und Inkubationsmedium Hanks' balanced salt solution (HBSS, pH = 7.35) wurde aus 137 mM NaCl, 5.36 mM KCl, 1.26 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0.49 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.44 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.41 mM  $\text{MgSO}_4$ , 0.34 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 25.0 mM 2[4-(2-Hydroxy-ethyl)-1-piperazinyl]ethansulfonsäure (HEPES) in Wasser hergestellt.

Darstellung der  $\text{Fe}^{3+}$ /8-Hydroxychinolinlösung:

In 10.0 mL Dimethylsulfoxid wurden zunächst 29.4 mg 8-Hydroxychinolin (0.02 M) gelöst. Dieser farblosen Lösung wurden unter Rühren 27.0 mg Eisen(III)chlorid Hexahydrat (0.01M) zugefügt. Die sofort eintretende Bildung des membran-permeablen  $\text{Fe}^{3+}$ /8-Hydroxychinolin-Komplexes kann anhand der tief-schwarzen Färbung der resultierenden Lösung erkannt werden. Um eine Endkonzentration von 10.0  $\mu$ M  $\text{Fe}^{3+}$  innerhalb der Messkammern zu erreichen, mussten 6.00  $\mu$ L der  $\text{Fe}^{3+}$ -Salzlösung zu 6.00 mL HBSS gegeben werden.

Darstellung der PIH-Lösung:

In 200  $\mu$ L 0.10 M Natriumhydroxidlösung wurden im Ultraschallbad 5.72 mg PIH gelöst. 140  $\mu$ L dieser Lösung wurden in einem Eppendorf-Cup mit 860  $\mu$ L auf 37 °C temperiertem HBSS verdünnt. Die entstehende Lösung wurde unmittelbar vor dem

zellulären Einsatz mit 1.00 m Salzsäure auf einen pH-Wert von 7.35 eingestellt. Durch Zugabe dieser Lösung zu einem Volumen von 6.00 mL HBSS wurde eine Endkonzentration von 2.00 mM PIH in den Pentz-Kammern erreicht.

### 8.6.2 organellespezifische Verteilung der Fluoreszenzindikatoren

Zur Analyse der subzellulären Verteilung des Indikators Piro (**13**) wurden die Deckgläschen mit den adhärenenten Hepatozyten in Pentz-Kammern eingeschraubt, die Zellen zweimal mit je 4.00 mL HBSS (37 °C) gewaschen, anschließend in der Dunkelkammer simultan mit Indikator **13** (jeweils 0.50 - 2.00 µM) und einer identischen Konzentration an Rhodamin 123 in HBSS beladen (20 min, 37 °C). Um eine möglichst gleichmäßige Beladung der Zellen sicherzustellen, wurden entsprechend 3.00 bis 12.00 µL der jeweiligen Indikator-Stammlösungen (1.00 mM) zu 6.00 mL HBSS (37 °C) pipettiert und die Zellen mit den resultierenden verdünnten Indikatorlösungen bedeckt. Um die Indikatoren und auch die Zellen vor einer photochemischen Schädigung zu schützen, wurden die beladenen Zellen ausschließlich unter Lichtausschluss behandelt. Im Anschluss an die Beladung wurden die Zellen mit HBSS (37 °C) gewaschen, um extrazellulär vorliegenden Indikator zu entfernen. Eine Nach-inkubation von 15 Minuten bei 37 °C sollte die vollständige intramitochondriale Akkumulation und somit eine selektive Beladung der Mitochondrien gewährleisten. Die Fluoreszenzmessungen zur Untersuchung der Zellen fand am Laser-Scanning-Mikroskop bei  $\lambda_{\text{exc.}} = 543 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} \geq 585 \text{ nm}$  (zur Erfassung der roten Indikatorfluoreszenz) und  $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 505 - 530 \text{ nm}$  (zur Erfassung der grünen Rhodamin 123-Fluoreszenz) in sukzessiven Scans unter Verwendung des Objektivs 63x NA 1.40 Plan-Apochromat statt.

Zur Analyse der subzellulären Verteilung der Indikatoren Phenac (**8**) und BDA (**63**) wurden die Deckgläschen mit Leberendothelzellen (Hepatozyten und Fibroblasten nur im Falle von **63**) in Pentz-Kammern eingeschraubt, die Zellen zweimal mit je 4.00 mL HBSS (37 °C) gewaschen, anschließend in der Dunkelkammer simultan mit den Fluoreszenzindikatoren (jeweils 0.50 - 2.00 µM) und einer identischen Konzentration an „Lyso-Tracker-red“ in HBSS beladen (30 min, 37 °C). Um eine möglichst gleichmäßige



Beladung der Zellen sicherzustellen, wurden entsprechend 3.00  $\mu\text{L}$  bis 12.00  $\mu\text{L}$  der jeweiligen Indikator-Stammlösungen (1.00 mM) zu 6.00 mL HBSS (37 °C) pipettiert und die Zellen mit den resultierenden verdünnten Indikatorlösungen bedeckt. Um die Indikatoren und auch die Zellen vor einer photochemischen Schädigung zu schützen, wurden die beladenen Zellen ausschließlich unter Lichtausschluss behandelt. Im Anschluss an die Beladung wurden die Zellen mit HBSS (37 °C) gewaschen, um extrazellulär vorliegenden Indikator zu entfernen. Eine Nachinkubation von 20 Minuten bei 37 °C sollte die vollständige intralysosomale Akkumulation und somit eine selektive Beladung der Lysosomen/ Endosomen gewährleisten. Die Fluoreszenzmessungen zur Untersuchung der Zellen fand am Laser-Scanning-Mikroskop bei  $\lambda_{\text{exc.}} = 543 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} \geq 585 \text{ nm}$  (zur Erfassung der roten Lyso-Tracker red Fluoreszenz) und  $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 505 - 530 \text{ nm}$  (zur Erfassung der grünen Fluoreszenz der Sonden **8** und **63**) in sukzessiven Scans unter Verwendung des Objektivs 63x NA 1.40 Plan-Apochromat statt.

### 8.6.3 Löschung der intrazellulären Fluoreszenz

Kultivierte Rattenhepatozyten im Falle von Indikator **13** wurden mit 1.00  $\mu\text{M}$  Indikator in HBSS (20 min, 37 °C) in einer modifizierten Pentz-Kammer unter Lichtausschluss in genannter Vorgehensweise beladen und in indikatorfreiem HBSS nachinkubiert (10 min, 37 °C). Darauf folgend wurde die intramitochondriale Ausgangsfluoreszenz bestimmt, die Geräteeinstellungen so gewählt, dass der Ausgangswert relativ hoch und somit eine Abnahme der Fluoreszenzintensität gut detektierbar war. Zur Erhöhung des intramitochondrialen Eisenpools wurde  $\text{Fe}^{3+}/8$ -Hydroxychinolin in einer Konzentration von 10.0  $\mu\text{M}$  zugegeben. Nach 5 und 15 Minuten erfolgten weitere Messungen.

Kultivierte Endothelzellen im Falle von Indikator BDA (**63**) wurden mit 1.00  $\mu\text{M}$  in HBSS (45 min, 37°C) in einer Pentz-Kammer unter Lichtausschluss beladen und in indikatorfreiem HBSS nachinkubiert (15 min., 37°C). Darauf folgend wurde die intrazelluläre Ausgangsfluoreszenz bestimmt, die Geräteeinstellungen so gewählt, dass der Ausgangswert relativ hoch und somit eine Abnahme der Fluoreszenzintensität gut detektierbar war. Zur Erhöhung des intrazellulären Eisenpools wurde  $\text{Fe}^{3+}/8$ -

Hydroxychinolin in einer Konzentration von 10.0  $\mu\text{M}$  zugegeben. Nach 5 und 15 Minuten erfolgten weitere Messungen

#### **8.6.4 Quantifizierung des chelatisierbaren Eisens in Mitochondrien**

Zur Bestimmung des intramitochondrialen chelatisierbaren Eisens kultivierter Rattenhepatozyten wurden Hepatozyten mit dem Indikator Piro (**8**) (1.00  $\mu\text{M}$ , 20 min, 37 °C) beladen und nachinkubiert (10 min, 37 °C). Vor der Nachinkubation in indikatorfreiem HBSS wurde das jeweilige Deckgläschen mit den adhären Hepatozyten in eine zweite, vortemperierte Pentz-Kammer überführt, um eine Verfälschung des Ergebnisses durch eventuell an der Kammerwand anhaftende Indikatorreste zu vermeiden. Im Anschluss erfolgte die Auswahl morphologisch repräsentativer Zellen. Dabei war vor allem auf eine ausreichende Zellenzahl (30 - 40) zu achten. Die nachfolgenden Fluoreszenzmessungen wurden in HBSS (37 °C) am Laser-Scanning-Mikroskop ( $\lambda_{\text{exc}} = 543 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} \geq 560 \text{ nm}$ , Objektiv 63x NA 1.40 Plan-Apochromat) durchgeführt. Nach jeweils drei Aufnahmen der zellulären Ausgangsfluoreszenz im Abstand von zehn Minuten wurde dem Zellüberstand PIH (2.00 mM) zugesetzt und danach in Zeitintervallen von etwa zehn Minuten der intrazelluläre Fluoreszenzanstieg aufgezeichnet. Bei PIH-Zugabe war vor allem auf ein gleichmäßiges Verteilen der Entquencherlösung auf den Zellen ohne Verrücken der Messkammer zu achten. Für jeden Messzeitpunkt wurde das Gesichtsfeld auf Objektbewegungen überprüft und bei Bedarf manuell repositioniert. Während der gesamten Messzeit wurden die Messkammern zur Konstanthaltung des Zellüberstandsvolumens mit einem Deckgläschen verschlossen gehalten. Nach insgesamt 120 Minuten wurde dem Zellüberstand 5.00  $\mu\text{g/mL}$  Propidiumiodid in bidestilliertem Wasser zugesetzt und unter identischen Parametern eine Bildaufnahme gestartet. Bei der nachfolgenden Bildanalyse wurden Propidiumiodid-positive, d. h. tote Zellen sowie Zellen, deren intramitochondriale Fluoreszenzintensität außerhalb des Detektorbereiches lag, nicht berücksichtigt. Zur Auswertung der Messungen wurde die mittlere intramitochondriale Indikatorfluoreszenz nach Abzug des Leerwertes (Hintergrundfluoreszenz) bestimmt.

Die intramitochondriale Konzentration des eisenfreien und damit fluoreszierenden Indikators PIRO wurde nun durch direkten Vergleich der mittleren intramitochondrialen Indikatorfluoreszenz (angegeben in arbitrary units, a.u.) vor und nach vollständiger Entquenchung durch PIH-Zugabe (2.00 mM) mit der Fluoreszenz-intensität von 30.0 bis 120  $\mu\text{M}$  Indikatorstandards in einem TRIS/HCl-Puffer (37 °C) bestimmt. Die ex situ-Kalibrierungen wurden für jede einzelne Zellmessreihe am Laser-Scanning-Mikroskop auf Deckgläschen in Pentz-Messkammern vorgenommen.

### **8.6.5 Quantifizierung des chelatisierbaren Eisens in Lysosomen / Endosomen**

Zur Bestimmung des intralysosomalen chelatisierbaren Eisens kultivierter Rattenendothelzellen wurden Leberendothelzellen mit dem Indikator BDA (0.50 -1.00  $\mu\text{M}$ , 40 min, 37 °C) beladen und nachinkubiert (15 min, 37 °C). Im Anschluss erfolgte die Auswahl morphologisch repräsentativer Zellen. Dabei war vor allem auf eine ausreichende Zellenzahl (10 - 20) zu achten. Die nachfolgenden Fluoreszenzmessungen wurden in HBSS (37 °C) am Laser-Scanning-Mikroskop ( $\lambda_{\text{exc}} = 514 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} \geq 530\text{-}600 \text{ nm}$ , Objektiv 63x NA 1.40 Plan-Apochromat) durchgeführt. Nach jeweils drei Aufnahmen der zellulären Ausgangsfluoreszenz im Abstand von zehn Minuten wurde dem Zellüberstand Desferal (5.00 mM) zugesetzt und danach in Zeitintervallen von etwa zehn Minuten der intrazelluläre Fluoreszenzanstieg aufgezeichnet. Für jeden Messzeitpunkt wurde das Gesichtsfeld auf Objektbewegungen überprüft und bei Bedarf manuell repositioniert. Während der gesamten Messzeit wurden die Messkammern zur Konstanthaltung des Zellüberstandsvolumens mit einem Deckgläschen verschlossen gehalten. Nach 120 Minuten wurden dem Zellüberstand 5.00  $\mu\text{g/mL}$  Propidiumiodid in bidestilliertem Wasser zugesetzt. Zur Auswertung der Messungen wurde die mittlere intralysosomale Indikatorfluoreszenz nach Abzug des Leerwertes (Hintergrundfluoreszenz) bestimmt.

Die intralysosomale Konzentration des eisenfreien und damit fluoreszierenden Indikators BDA wurde durch direkten Vergleich der mittleren intralysosomalen Indikatorfluoreszenz (angegeben in arbitrary units, a.u.) vor und nach Desferal-Zugabe (5.00 mM) mit der Fluoreszenz-intensität von 10.0 bis 80  $\mu\text{M}$  Indikatorstandards in

einem Acetat-Puffer (37 °C) bestimmt. Die ex situ-Kalibrierungen wurden für jede einzelne Zellmessreihe am Laser-Scanning-Mikroskop auf Deckgläschen in Pentz-Messkammern vorgenommen.

## **8.7 Zellen**

### **8.7.1 Versuchstiere**

Für die Zellenisolation wurden männliche Ratten des Wistar-Stammes (180-350 g) vom Zentralem Tierlaboratorium des Universitätsklinikums Essen bezogen. Sie wurden unter Standardbedingungen (Temperatur  $21 \pm 2^\circ\text{C}$ , relative Luftfeuchte  $55 \pm 5\%$ , konstantem Hell-Dunkel-Rhythmus von je 12 Stunden, Standardfutter und Wasser *ad libitum*) in Übereinstimmung mit den geltenden Tierschutzgesetzen gehalten.

### **8.7.2 Präparation und Kultivierung von Rattenhepatozyten**

Nach der von de Groot et. al. beschriebenen Methode wurden die Hepatozyten isoliert. Auf kollagenbeschichtete Deckgläschen mit einer Oberfläche von  $6.20\text{ cm}^2$  wurden die für die fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen vorgesehenen Hepatozyten mit einer Dichte von  $1.70 \cdot 10^5$  Zellen /  $\text{cm}^2$  (ermittelt mit einer Neubauer-Zählkammer, Brand, Wertheim/Main, Deutschland) in Zellkultur-Petrischalen eingesetzt. Die Kultivierung erfolgte in L-15-Medium und wurde ergänzt durch fötales Kälberserum (5.0%), L-Glutamin (2.0 mM), Glukose (8.3 mM), Rinderserumalbumin (0.1%), Natriumhydrogencarbonat (14.3 mM), Gentamycin (50  $\mu\text{g/mL}$ ) und Dexamethason (1.0  $\mu\text{M}$ ) bei einer Temperatur von  $37^\circ\text{C}$  unter einer Atmosphäre von 5.00%  $\text{CO}_2$  und 95% Raumluft mit einer Luftfeuchtigkeit von 100% in einem Brutschrank (modell 6000, Heraeus, Hanau, Deutschland). Die Zellen wurden 2 Stunden nach dem Einsetzen mit HBSS gewaschen und für weitere 20-24 Stunden bis zum Beginn der Experimente in L-15-Medium unter Zusatz von 60  $\mu\text{M}$   $\alpha$ -Tocopherol (Stammlösung 10 mg/mL in Ethanol) kultiviert.

### 8.7.3 Kultivierung von Rattenleberendothelzellen

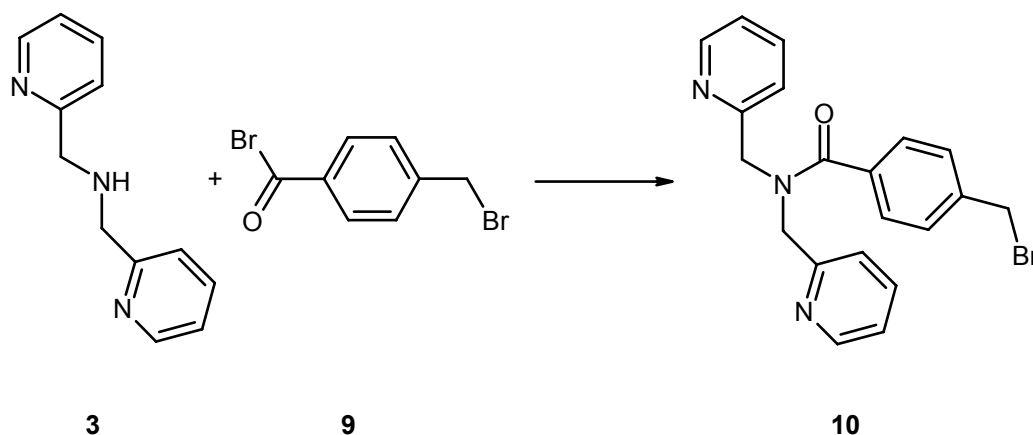
Leberendothelzellen einer Zelllinie, die aus der Leber männlicher Ratten des Wistar-Stammes etabliert wurde, wurden in RPMI 1640-Medium, ergänzt mit fötalem Kälberserum (20 %), L-Glutamin (2.0 mm), Penicillin/Streptomycin (50 U/mL bzw. 50 µg/mL) und Dexamethason (1.0 µm) (pH = 7.35), kultiviert. Subkulturen wurden durch Trypsinisierung gewonnen. Die Zellen wurden 1 : 3 gesplittet, auf fibronektin-beschichteten Deckgläschen (6.20 cm<sup>2</sup>) in Zellkulturpetrischalen eingesetzt und zwei Tage nach der Subkultivierung für die Experimente verwendet. 20 Stunden vor den Experimenten wurden die Zellen in einem L-15-Medium unter Zusatz von 60 µM α-Tocopherol kultiviert.

### 8.7.4 Kultivierung von Fibroblasten

Zellen der Murin Fibroblasten Zelllinie L929 wurden in einem Eagle Medium kultiviert. Dieses Medium wurde ergänzt durch fötales Kälberserum (10%), L-Glutamin (2.0 mM), Penicilin/Streptomycin (100 U/mL bzw. 100 µg/mL). Die Kultivierung erfolgte in 75 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen in einer Atmosphäre bestehend aus 95% Luft und 5% CO<sub>2</sub> bei 37°C. Die Subkultivierung erfolgte durch gezielte Behandlung mit Trypsin (0.25% (v/v) trypsin) . Für alle durchgeführten Messungen wurden die Zellen mit einer Dichte von  $2 \cdot 10^4$  Zellen / cm<sup>2</sup> auf Glasplättchen (6.2 cm<sup>2</sup>) verwendet. Die Messungen erfolgten 48 Stunden nach der Subkultivierung. 20 Stunden vor den Experimenten wurden die Zellen mit einem 'L-15-Medium unter Zusatz von 60 µM α-Tocopherol kultiviert.

## 8.8 Synthese der mitochondrialen Fluoreszenzsonde

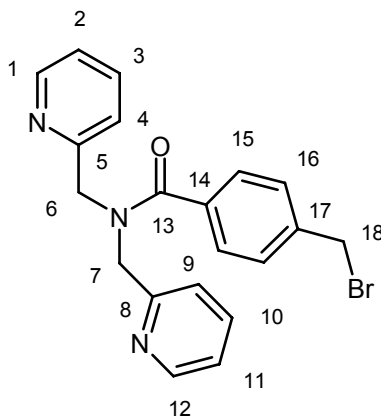
### 8.8.1 Synthese von 4-(Brommethyl)-N,N-bis(pyridin-2-yl-methyl)benzamid (**10**)



Zu einer, auf 0°C gekühlten Lösung, aus 2.11 g (10.6 mmol) N,N-Bis(pyridin-2-yl-methyl)amin (**3**) in 30 mL absolutem Tetrahydrofuran wurde innerhalb von 10 Minuten eine Lösung aus 2.94 g (10.6 mmol) 4-Bromomethyl-benzylbromid (**9**) in 10 mL THF zugetropft. Die Reaktionsmischung wurde 90 Minuten bei 0°C gerührt und der ausgefallene weiße Feststoff über eine Glasfritte (G IV) vom Lösungsmittel befreit. Die Reinigung erfolgte mittels Umkristallisation in Ethanol.

**Ausbeute:** 2.26 g (4.70 mmol) 4-(Bromomethyl)-N,N-bis(pyridin-2-yl-methyl)-benzamid (**10**), 45%.

**Charakterisierung:**



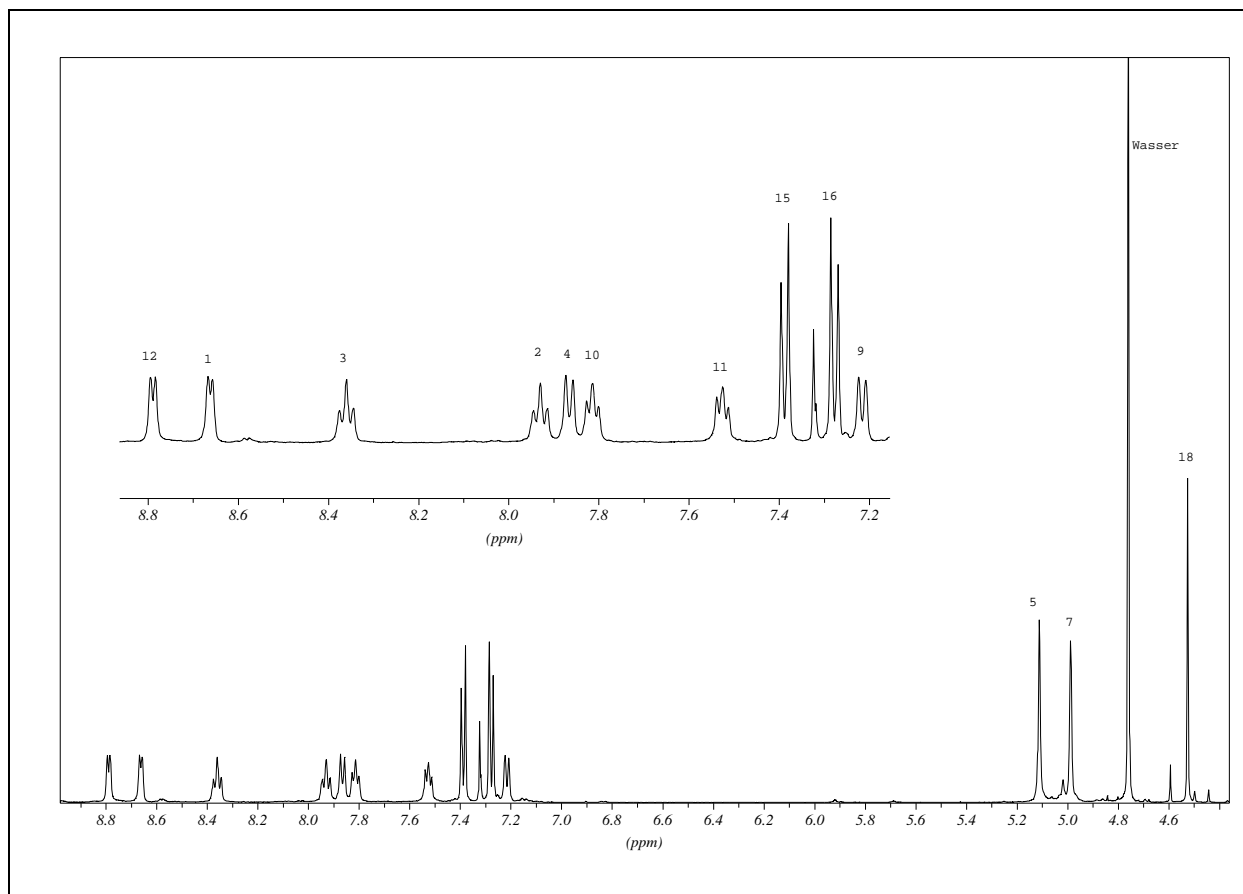


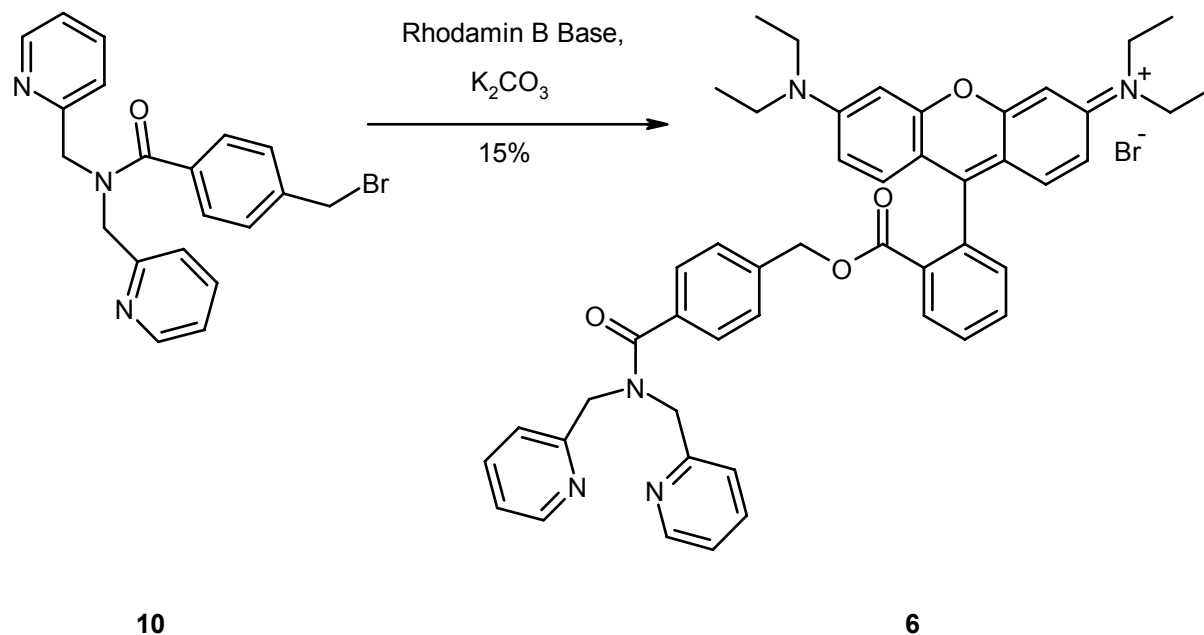
Abbildung 49 :  $^1\text{H}$ -NMR spektrum von **10** in  $\text{D}_2\text{O}$  bei 500 MHz.

$^1\text{H}$ -NMR (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = 4.52 (s, 2H, 18-H), 4.99, 5.11 (2 s, je 2H, 6-H, 7-H), 7.22 (d, 1H, 9-H,  $^3J\{9\text{-H}, 10\text{-H}\} = 7.75$  MHz), 7.28 (d, 2H, 16-H,  $^3J\{16\text{-H}, 15\text{-H}\} = 8.2$  Hz), 7.39 (d, 2H, 15-H,  $^3J\{15\text{-H}, 16\text{-H}\} = 8.2$  Hz), 7.52 (t, 1H, 12-H), 7.81 (t, 1H, 11-H), 7.87 (t, 1H, 3-H,  $^3J\{3\text{-H}, 4\text{-H}\} = 5.3$  Hz,  $^3J\{3\text{-H}, 2\text{-H}\} = 7.8$  Hz), 7.92 (t, 1H, 10-H), 8.36 (t, 2H, 3-H), 8.67 (d, 2H, 12-H), 8.79 (2H, 1-H)

$^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$ [ppm] = 50.45 (18-C), 54.47, 63.02 (6-C, 7-C), 123.76, 124.30 (2-C, 11-C), 125.18, 125.24 (4-C, 9-C), 126.59, 129.16 (15-C, 16-C), 133.11, 141.00 (14-C, 17-C), 141.47, 141.53 (3-C, 10-C), 142.89, 144.83 (1-C, 12-C), 152.01, 153.71 (5-C, 8-C), 174.58 (13-C).

Da sich in Verbindung **10** eine Amidbindung befindet, die eine gehinderte Rotation um die Bindung verursacht, sind die Protonen 1-12 chemisch nicht äquivalent.

### 8.8.2 Synthese von 4-(Brommethyl)-N,N-bis(pyridin-2-yl-methyl)benzamid (**6**)



0.13 g (0.28 mmol) 4-(Bromomethyl)-N,N-bis(pyridin-2-yl-methyl)benzamid (**10**) und 0.12 g (0.28 mmol) Rhodamin B Base wurden in 30 mL Dimethylformamid gelöst und mit 0.04 g Kaliumcarbonat versetzt. Nachdem die Reaktionsmischung 24 Stunden bei 100 °C gerührt wurde, konnte das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum entfernt werden. Die Reinigung erfolgte mittels Säulenchromatographie (Aluminiumoxid<sub>neutral</sub>, 10% desaktiviert, 250 g, Laufmittel, Dichlormethan 7/ Hexan 3/ Ethanol 1).

Ausbeute: 0.12 g (0.15 mmol), 4-(Bromomethyl)-N,N-bis(pyridin-2-yl-methyl)-benzamid (**6**), 53%



Charakterisierung :

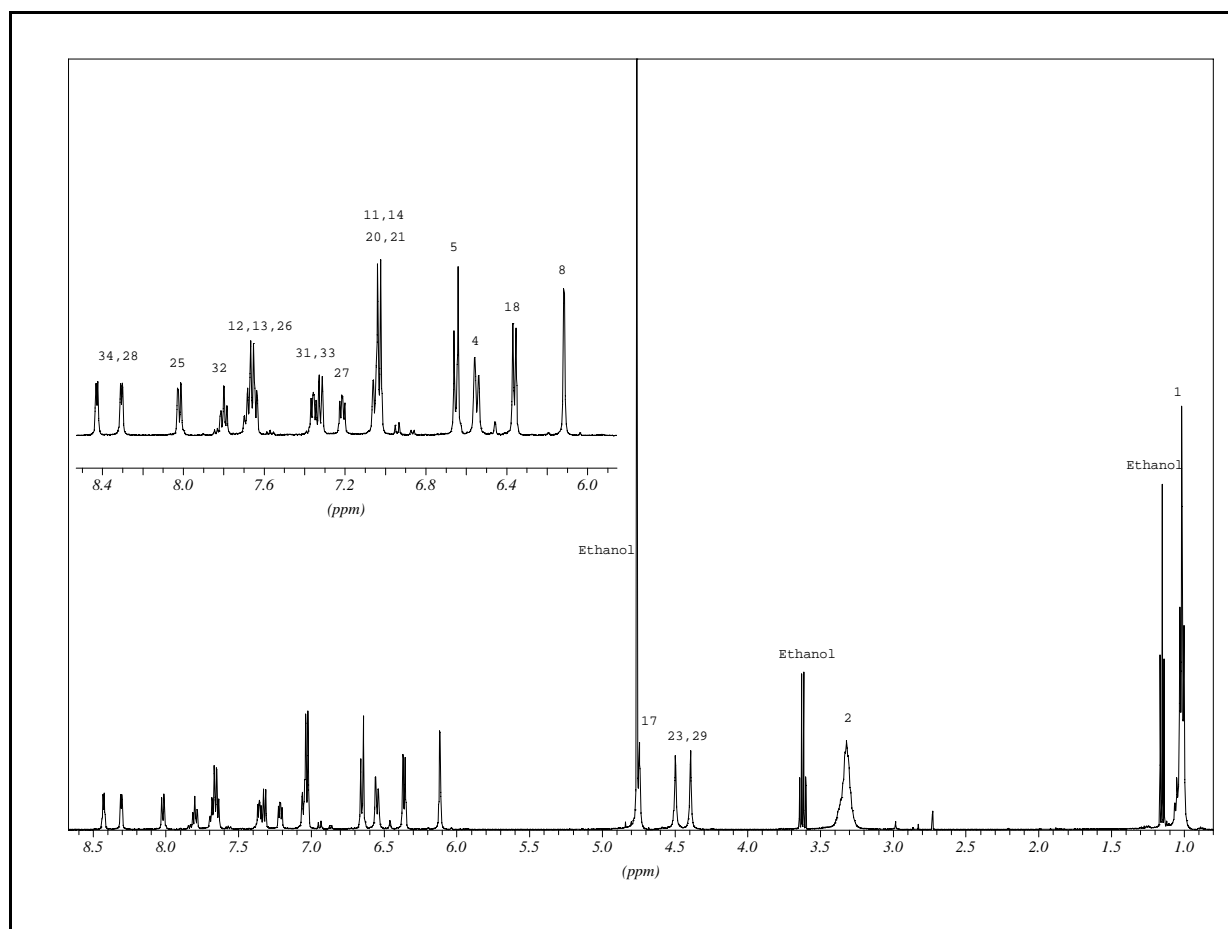
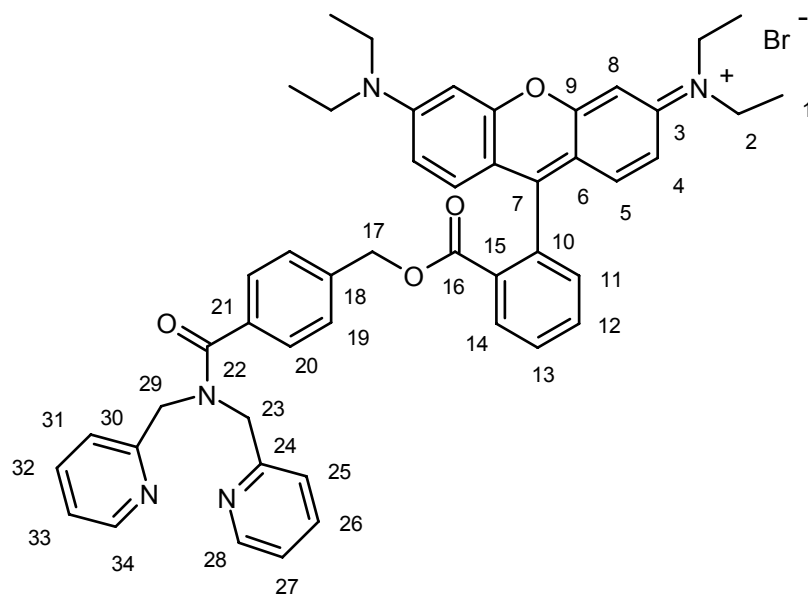


Abbildung 50 :  $^1\text{H}$ -NMR spektrum von **13** in DMSO bei 500 MHz.

$^1\text{H}$ -NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta[\text{ppm}] = 1.2$  (t, 12H, 1-H), 3.6 (q, 8H, 2-H), 4.93 (s, H, 23-H), 4.49 (s, 2H, 29-H), 4.74 (s, 2H, 17-H), 6.11 (s, 2H, 8-H), 6.36 (d, 2H, 19-H,  $^3J\{19\text{-H}, 20\text{-H}\} = 8.05\text{Hz}$ ), 6.55 (d, 2H, 4-H,  $^3J\{4\text{-H}, 5\text{-H}\} = 9.45\text{Hz}$ ), 6.65 (d, 2H, 5-H,  $^3J\{5\text{-H}, 4\text{-H}\} = 9.45\text{Hz}$ ), 7.03 (m, 4H, 11-H, 14-H, 20-H), 7.15 (dd, 1H, 27-H,  $^3J\{27\text{-H}, 28\text{-H}\} = 4.6\text{ Hz}$ ,  $^3J\{27\text{-H}, 26\text{-H}\} = 3.9\text{ Hz}$ ), 7.34 (m, 2H, 31-H, 33-H), 7.65 (m, 3H, 12-H, 13-H, 26-H), 7.79 (m, 1H, 32-H), 8.02 (d, 1H, 25-H), 8.03 (d, 2H, 28-H), 8.43 (d, 2H, 34-H).

$^{13}\text{C}$ -NMR (125MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta[\text{ppm}] = 11.84$  (C-1), 45.40 (C-2), 50.59 (C-23), 54.27 (C-29), 66.66 (C-17), 95.47 (C-8), 112.24 (C-3), 113.71 (C-12), 122.02 (C-27), 122.55 (C-33), 123.21 (C-13), 123.29 (C-14), 126.42 (C-31), 127.52 (C-25), 128.87 (C-21), 129.9 (C-20), 130.42 (C-19), 131.14 (C-4), 132.28 (C-18), 133.14 (C-5), 134.89 (C-15), 135.25 (C-10), 137.96 (C-32), 138.06 (C-26), 148.61 (C-28), 148.98 (C-34), 154.63 (C-24), 154.72 (C-9), 155.26 (C-30), 156.07 (C-7), 156.36 (C-6), 166.14 (C-16), 172.99 (C-22).

Massenspektroskopie: hochaufgelöstes Spektrum (ESI, positive ion mode in Methanol, 5  $\mu$ M)

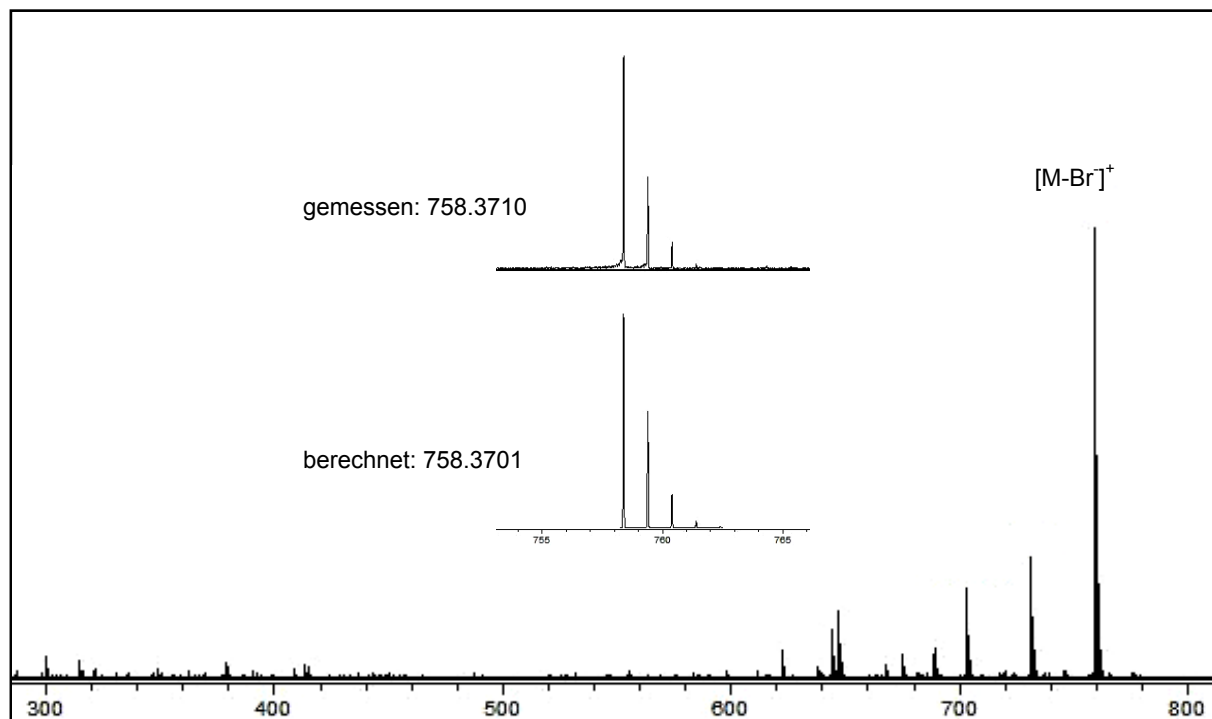


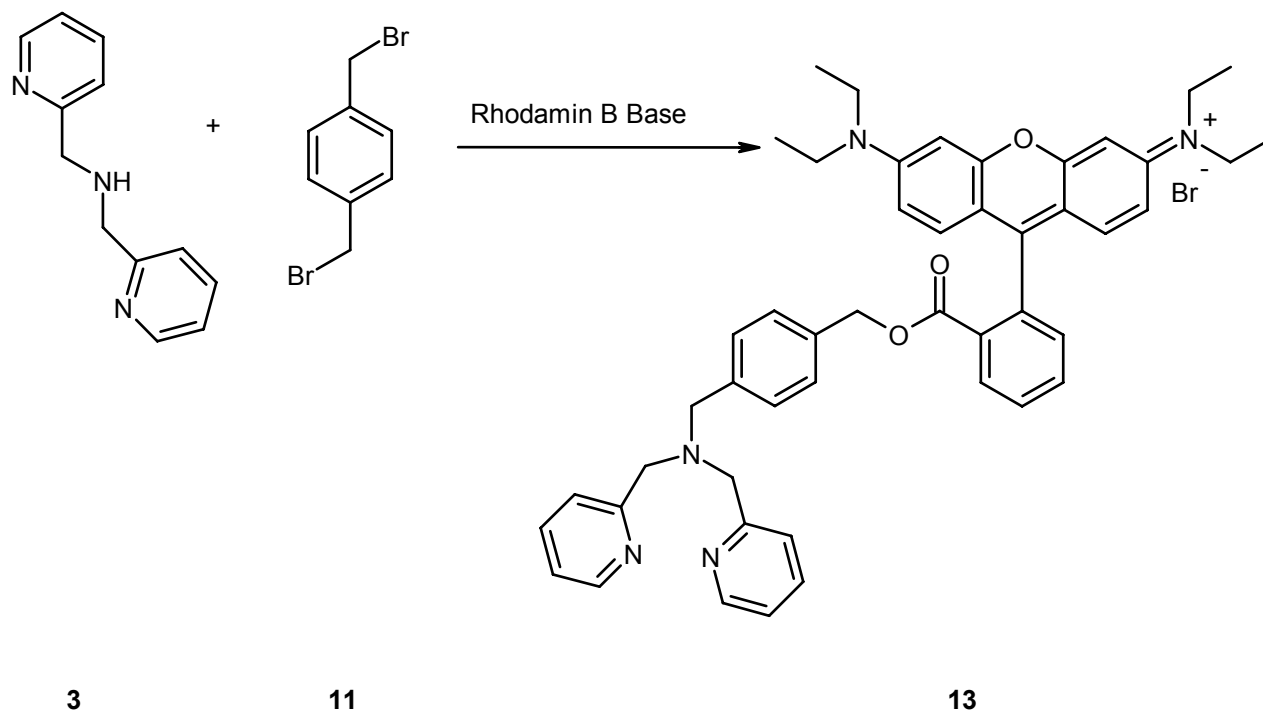
Abbildung 51 : hochaufgelöstes Massenspektrum von **6**

berechnete monoisotopische Masse für  $C_{48}H_{48}N_5O_4$  [M – Br]<sup>+</sup>: 758.3701

gemessen: 758.3710

Abweichung: 0.9 ppm

### 8.8.3 Synthese von Rhodamin B-[bis(pyridin-2-yl-methyl)aminobenzylester (13)



0.26 g (1.00 mmol) α, α'-Dibrom-p-xylol wurden in 40.0 mL Chloroform gelöst und mit 0.07 g (0.50 mmol) fein gemörsertem Kaliumcarbonat versetzt. Zu der Reaktionslösung wurde innerhalb von 15 Minuten eine Lösung aus 0.20 g (1.00 mmol) Di-(2-picolyl)amin in 10.0 mL Chloroform zugetropft. Die Reaktionsmischung wurde drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt und danach mit 0.80 g (2.00 mmol) Rhodamin B Base versetzt. Das erhaltene Reaktionsgemisch wurde weitere 64 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und danach vom Lösungsmittel befreit und in 5 mL des Laufmittelgemisches aufgenommen. Die Reinigung erfolgte mittels Säulenchromatographie (Länge 30 cm, Durchmesser 3 cm), über: Aluminiumoxid<sub>neutral</sub> (50.0 g, 10 % desaktiviert. mit Wasser), Laufmittel: Dichlormethan/ Hexan/ Ethanol, 10/ 4/ 2).

Ausbeute: 0.24 g (0.32 mmol) Rhodamin B-[bis(pyridin-2-yl-methyl)aminobenzylester (**13**), 32%.

Charakterisierung :

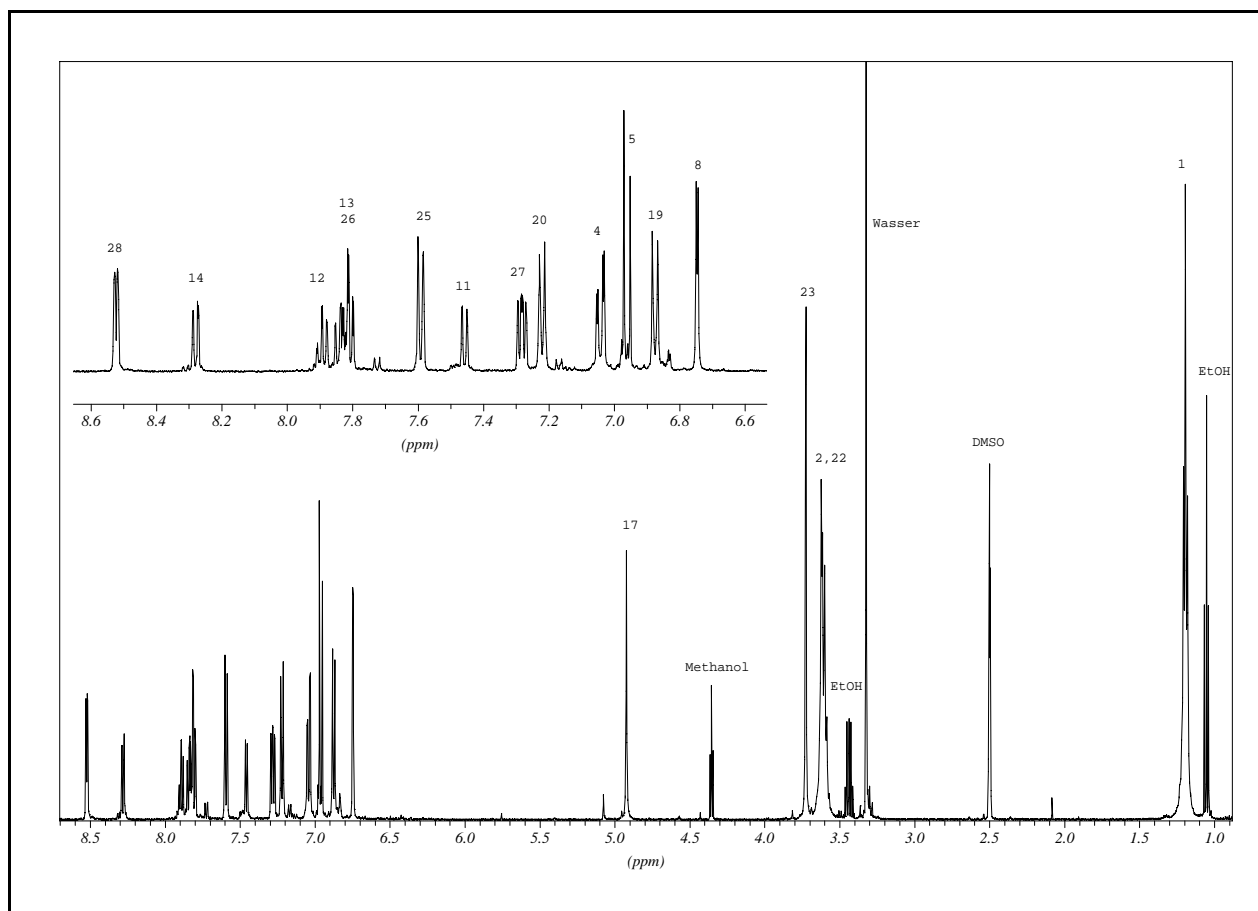
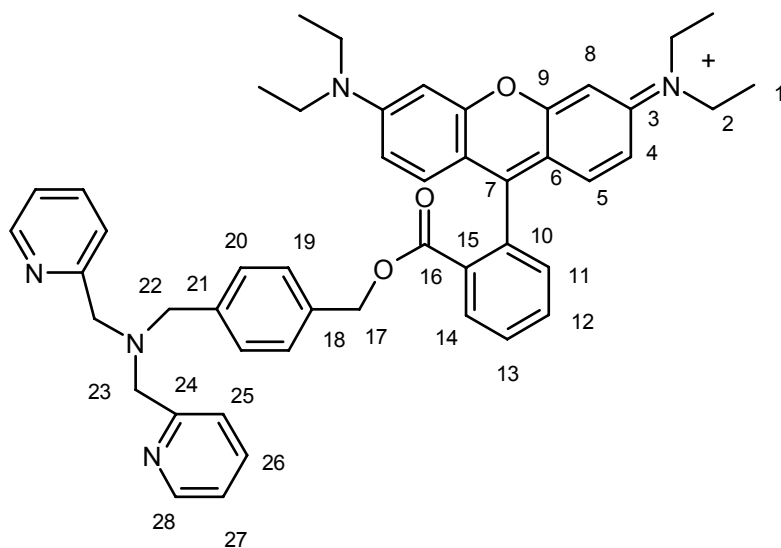


Abbildung 52 : <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von **13** in DMSO-d<sub>6</sub> bei 500 MHz.

$^1\text{H}$ -NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta[\text{ppm}] = 1.21$  (t, 12H, 1-H), 3.64 (q, 10H, 2-H, 22-H), 3.72 (s, 4-H, 23-H), 4.93 (s, 2H, 17-H), 6.74 (d, 2H, 8-H,  $^4J\{8\text{-H}, 4\text{-H}\} = 2.3\text{Hz}$ ), 6.87 (d, 2H, 19-H,  $^3J\{19\text{-H}, 20\text{-H}\} = 8.10\text{Hz}$ ), 6.96 (d, 2H, 5-H,  $^3J\{5\text{-H}, 4\text{-H}\} = 9.45\text{Hz}$ ), 7.03 (dd, 2H, 4-H,  $^3J\{4\text{-H}, 5\text{-H}\} = 9.45\text{ Hz}$ ,  $^4J\{4\text{-H}, 8\text{-H}\} = 2.3\text{Hz}$ ), 7.22 (d, 2H, 20-H,  $^3J\{20\text{-H}, 19\text{-H}\} = 8.1\text{Hz}$ ), 7.28 (m, 2H, 27-H,  $^3J\{27\text{-H}, 26\text{-H}\} = 4.68\text{Hz}$ ,  $^3J\{27\text{-H}, 28\text{-H}\} = 4.5\text{Hz}$ ), 7.55 (dd, 1H, 11-H,  $^3J\{11\text{-H}, 12\text{-H}\} = ^4J\{11\text{-H}, 13\text{-H}\} = 1.10\text{Hz}$ ), 7.59 (d, 2H, 25-H,  $^3J\{25\text{-H}, 26\text{-H}\} = 7.85\text{Hz}$ ), 7.32 (m, 4H, 13-H, 26-H), 7.89 (m, 2H, 12-H), 8.28 (dd, 1H, 14-H,  $^3J\{14\text{-H}, 13\text{-H}\} = 7.80\text{ Hz}$ ,  $^4J\{14\text{-H}, 12\text{-H}\} = 1.25\text{Hz}$ ), 8.52 (d, H, 28-H,  $^3J\{28\text{-H}, 27\text{-H}\} = 4.68\text{Hz}$ ).

$^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta[\text{ppm}] = 12.39$  (C-1), 45.05 (C-2), 57.07 (C-22), 58.89 (C-23), 66.72 (C-17), 95.64 (C-8), 112.79 (C-6), 114.49 (C-4), 122.19 (C-27), 122.41 (C-25), 127.82 (C-19), 128.51 (C-20), 129.33 (C-3), 130.41 (C-11), 130.46 (C-5), 130.78 (C-26), 130.95 (C-14), 132.87 (C-18), 133.16 (C-10), 133.27 (C-12), 136.61 (C-13), 138.57 (C-21), 148.89 (C-28), 154.93 (C-9), 156.93 (C-15), 157.30 (C-6), 158.95 (C-27), 164.68 (C-16).

Massenspektroskopie: hochaufgelöstes Spektrum (ESI, positive ion mode in Methanol, 10  $\mu$ M)

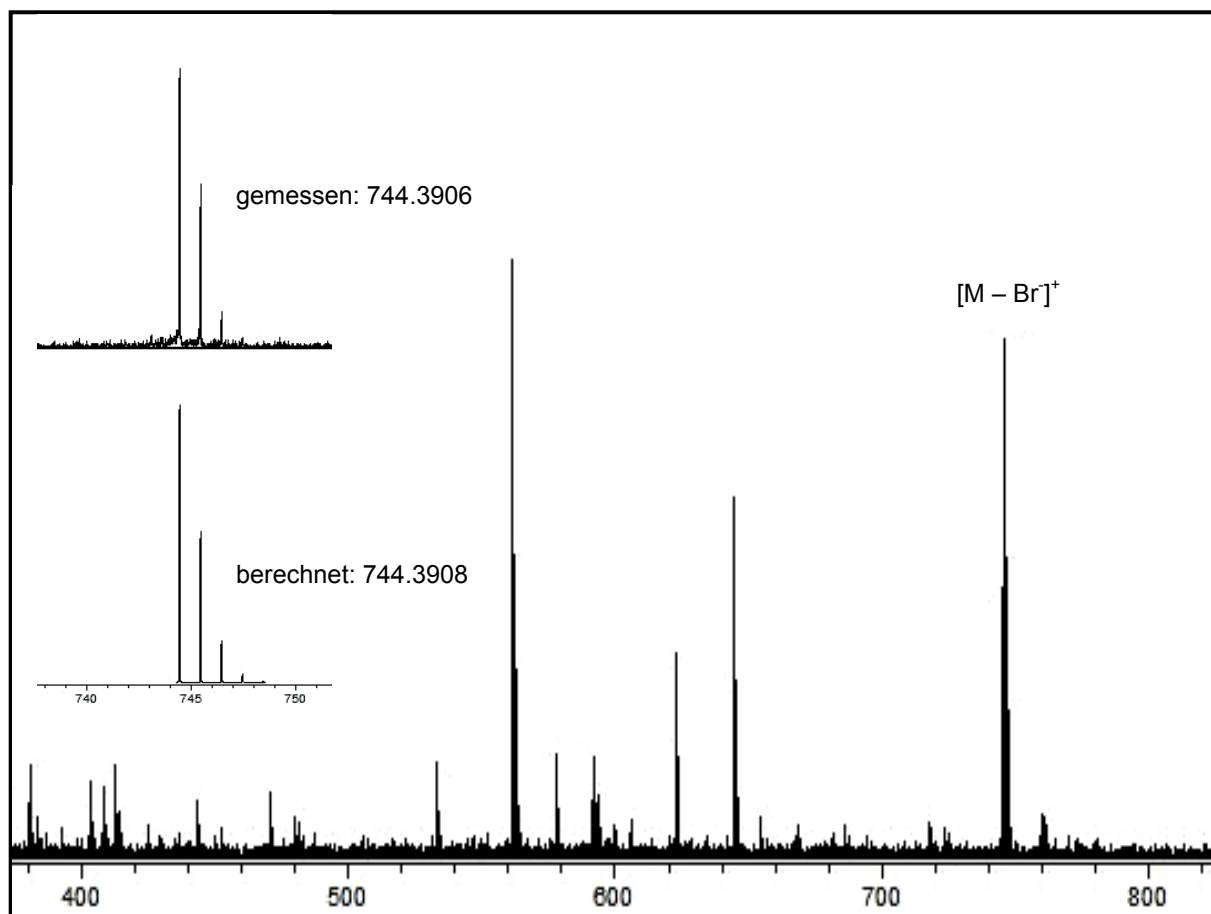


Abbildung 53 : hochaufgelöstes Massenspektrum von **13**

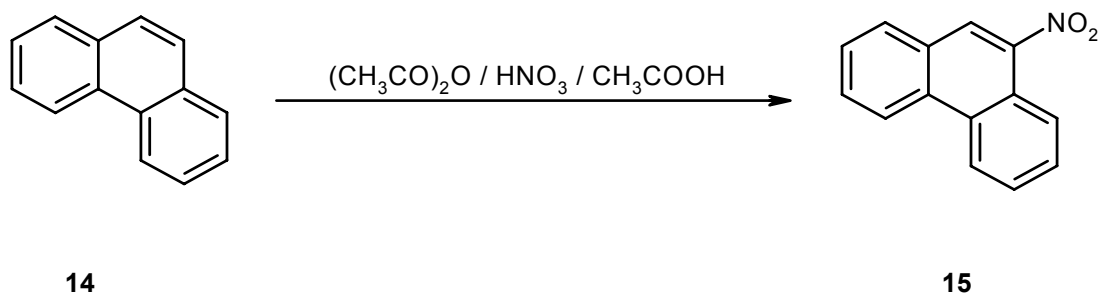
berechnete monoisotopische Masse für  $C_{48}H_{50}N_5O_3$   $[M - Br]^{+}$ : 744.3908

gemessen: 744.3906

Abweichung: 0.2 ppm

## 8.9 Synthese grüne Kontrolle

### 8.9.1 Synthese 9-Nitrophenanthren (**15**)<sup>[120]</sup>



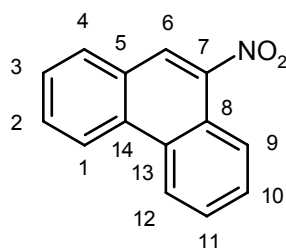
Zu 12.0 mL Essigsäureanhydrid wurden tropfenweise unter Rühren 6.00 mL Salpetersäure zugefügt. Diese Lösung wurde langsam zu einer Lösung von 8.00 g (4.90 mmol) Phenanthren (**14**) in 16.0 mL Eisessig getropft. Nach beendeter Zugabe wurde die Reaktionsmischung über einen Zeitraum von zwei Stunden bei 100°C gerührt und nach Abkühlung auf 500 mL Eiswasser gegeben. Die wässrige Phase wurde abdekantiert und der gelbe Rückstand in 75.0 mL Chloroform gelöst. Die wässrige Phase wurde mit 50.0 mL Chloroform extrahiert und die vereinigten organischen Phasen wurden nacheinander mit 25.0 mL Wasser, 25.0 mL 5.00proz. wässriger Natriumhydrogencarbonatlösung und 25.0 mL Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und im Anschluss am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingeeengt. Das Rohprodukt wurde im Ultraschallbad in 4.00 mL Toluol gelöst und säulenchromatographisch über Aluminiumoxid<sub>neutral</sub> (100 g) gereinigt. Als Eluat diente Hexan. Die vereinigten zitronengelben Produkt-Fractionen wurden vom Lösungsmittel befreit und aus Ethanol umkristallisiert. 9-Nitrophenanthren (**15**) wurde in Form gelber Kristalle erhalten.

Ausbeute: 3.50 g (15.5 mmol) 9-Nitrophenanthren (**15**), 34 % [Lit.<sup>[120]</sup>: 22%]

Schmelzpunkt: 116 °C [Lit.<sup>[120]</sup>: 117 °C]

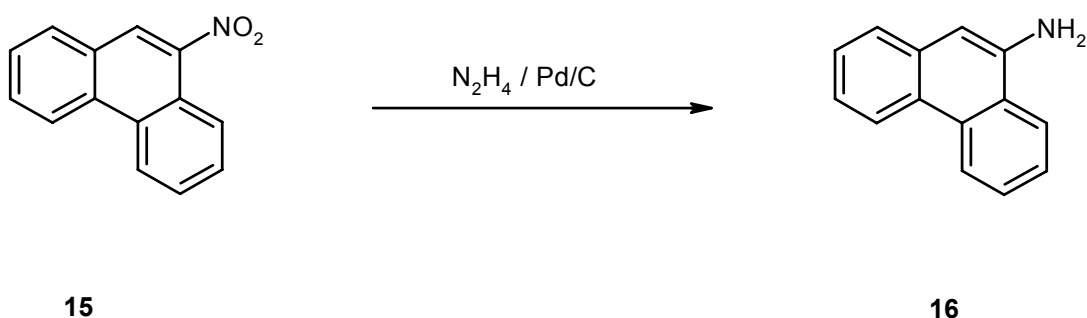


Charakterisierung:



$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 7.65 - 7.80 (m, 4 H, 2-H, 3-H, 10-H, 11-H), 7.96 (dd, 1 H, 9-H,  $^3J\{9\text{-H}, 10\text{-H}\} = 8.0$  Hz,  $^4J\{9\text{-H}, 11\text{-H}\} = 0.5$  Hz), 8.42 (s, 1 H, 6-H), 8.46 (m, 1 H, 4-H), 8.64 (d, 1 H, 1-H,  $^3J\{1\text{-H}, 2\text{-H}\} = 8.4$  Hz), 8.70 (m, 1 H, 12-H).

### 8.9.2 Synthese von 9-Phenanthryl-amin (**16**)<sup>[86]</sup>

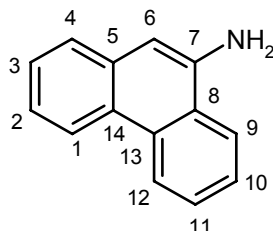


Zu einer Lösung von 3.40 g (15.2 mmol) 9-Nitrophenanthren (**15**) in 500 mL absolutem Ethanol wurden unter Inertgasatmosphäre 1.50 g Palladium auf Aktivkohle (10 % Pd) gegeben und anschließend 20.0 mL (411 mmol) Hydrazin-Monohydrat in 50.0 mL absolutem Ethanol über einen Zeitraum von 30 Minuten zugetropft. Die Reaktionsmischung wurde zunächst 15 Minuten bei Raumtemperatur und danach weitere 45 Minuten unter Rückfluss gerührt. Der Umsatz wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt (Aluminiumoxid<sub>neutral</sub>, Hexan/Chloroform = 5/1) Nach dem Abkühlen wurde die Reaktionsmischung über Celite filtriert und die orangegelbe Lösung am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt. Das orangegelbe Rohprodukt wurde aus Petrolether (100 - 120°C) umkristallisiert.

Ausbeute: 1.77 g (0.18 mmol) 9-Phenanthryl-amin (**16**), 60 %

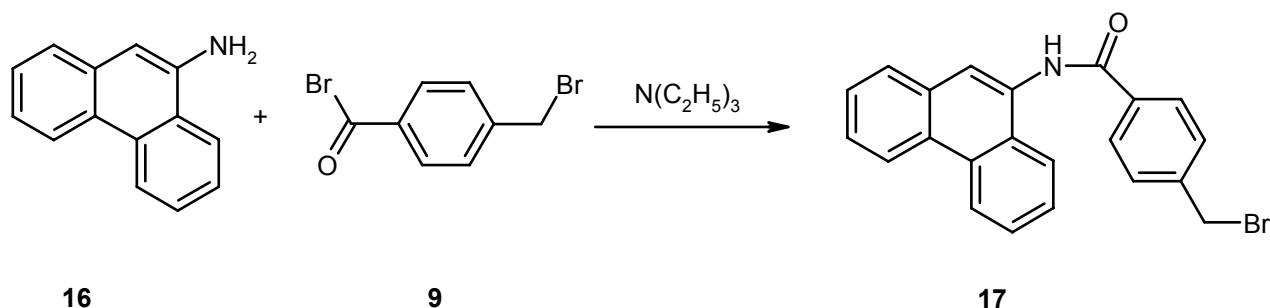
Schmelzpunkt: 134 °C [Lit<sup>[86]</sup>.:134 - 135 C]

Charakterisierung:



<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 4.10 (s, 2 H, 15-H), 6.97 (s, 1 H, 6-H), 7.44 (dd, 1 H, 2-H, <sup>3</sup>J{2-H,3-H} = <sup>3</sup>J{2-H,1-H} = 7.0 Hz, <sup>4</sup>J{2-H,4-H} = 1.4 Hz), 7.51 (dd, 1 H, 3-H, <sup>3</sup>J{3-H,2-H} = <sup>3</sup>J{3-H,4-H} = 8.0 Hz, <sup>4</sup>J{3-H,1-H} = 1.2 Hz), 7.61 - 7.69 (m, 3 H, 4-H, 10-H, 11-H), 7.91 (dd, 1 H, 9-H, <sup>3</sup>J{9-H,10-H} = 8.0 Hz, <sup>4</sup>J{9-H,11-H} = 0.9 Hz), 8.57 (d, 1 H, 1-H, <sup>3</sup>J{1-H,2-H} = 8.2 Hz), 8.71 (dd, 1 H, 12-H, <sup>3</sup>J{12-H,11-H} = 8.2 Hz, <sup>4</sup>J{12-H,10-H} = 0.7 Hz).

### 8.9.3 (Brommethyl)-N-9-phenanthryl-benzamid (**17**)<sup>[85]</sup>



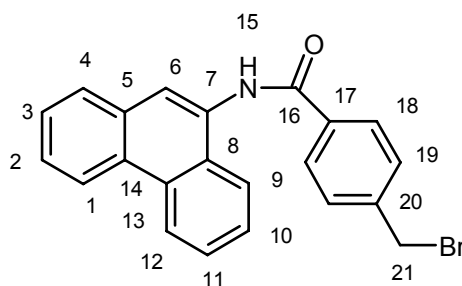
Eine Lösung von 1.30 g (4.71 mmol) 4-Bromomethyl-benzoylbromid (**9**) in 20.0 mL absolutem Acetonitril wurde bei Raumtemperatur und unter Inertgasatmosphäre langsam zu einer Lösung von 700 mg, 3.62 mmol) 9-Phenanthryl-amin (**16**) und 660 µL (477 mg, 4.71 mmol) Triethylamin in 50.0 mL absolutem Acetonitril getropft. Die Reaktionsmischung wurde 15 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend

filtriert. Das braune Filtrat wurde am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck bis zur Trockne eingengt, zweimal mit je 15.0 mL Chloroform im Ultraschallbad digeriert und wiederum abfiltriert. Nach dem Entfernen von Lösungsmittelresten im Ölpumpenvakuum konnte 4-(Brommethyl)-*N*-9-phenanthryl-benzamid als beigefarbener Feststoff erhalten werden.

Ausbeute: 910 mg (2.34 mmol) 4-(Brommethyl)-*N*-9-phenanthryl-benzamid (**17**), 65%, [Lit<sup>[85]</sup>.: 69%]

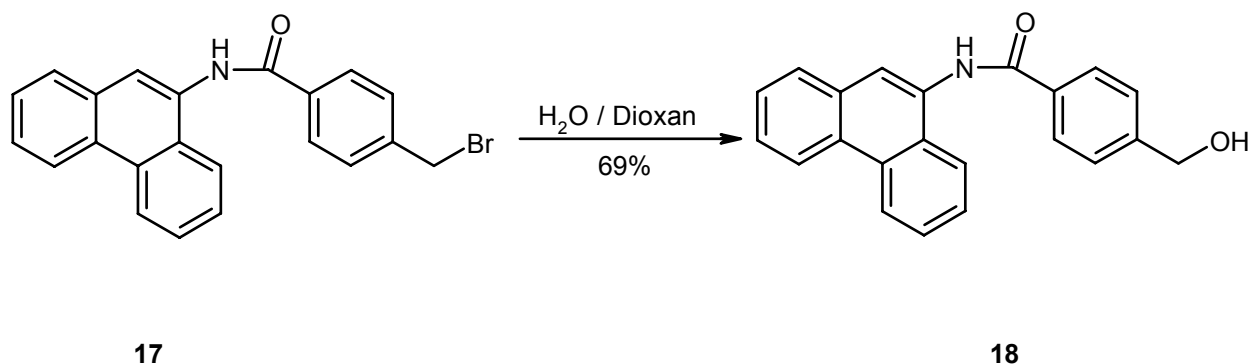
Schmelzpunkt: 213 °C [Lit<sup>[85]</sup>.: 201°C]

Charakterisierung:



<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ [ppm] = 4.78 (s, 2 H, 21-H), 7.61 - 7.73 (m, 6 H, 2-H, 3-H, 10-H, 11-H, 19-H), 7.94 (s, 1 H, 6-H), 7.98 (d, 1 H, 9-H, 3J{9-H,10-H} = 7.7 Hz, 4J{9-H,11-H} = 1.3 Hz), 8.05 - 8.09 (m, 3 H, 4-H, 18-H, 3J{18-H,19-H} = 8.4 Hz), 8.82 (d, 1 H, 1-H, 3J{1-H,2-H} = 8.0 Hz), 8.88 (d, 1 H, 12-H, 3J{12-H,11-H} = 8.2 Hz), 10.50 (s, 1 H, 15-H)

#### 8.9.4 Synthese von 4-(Hydroxymethyl)-N-9-phenanthryl-benzamid (**18**)

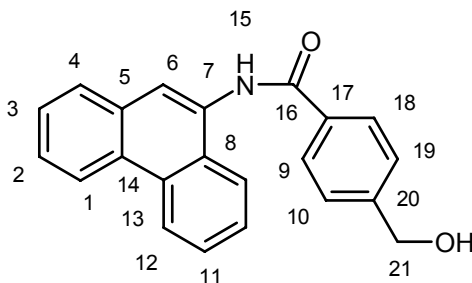


Eine Suspension aus 0.63 g (1.61 mmol) 4-(Bromomethyl)-N-9-phenanthryl-benzamid (**17**) wurde in einer Mischung aus 40 mL Wasser und 45 mL Dioxan suspendiert und auf Rückfluß erwärmt. Nach 30 Minuten löste sich der Feststoff vollständig auf. Die Reaktionslösung wurde zunächst 2 Stunden unter Rückfluß gehalten und dann weitere 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Der Umsatz wurde mittels Dünnschichtchromatographie (Kieselgel, Hexan/ Ethylacetat, 6/ 3) verfolgt. Nach Entfernung von 20 mL Dioxan im Ölpumpenvakuum und Zugabe von 20 mL Wasser wurde drei mal mit je 10 mL Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Produkt lag nach Entfernung des Lösungsmittels als hellbeiger Feststoff vor.

Ausbeute: 0.338 g (1.03 mmol), 4-(Hydroxymethyl)-N-9-phenanthryl-benzamid, (**18**), 64 %

Schmelzpunkt: 238°C

Charakterisierung:



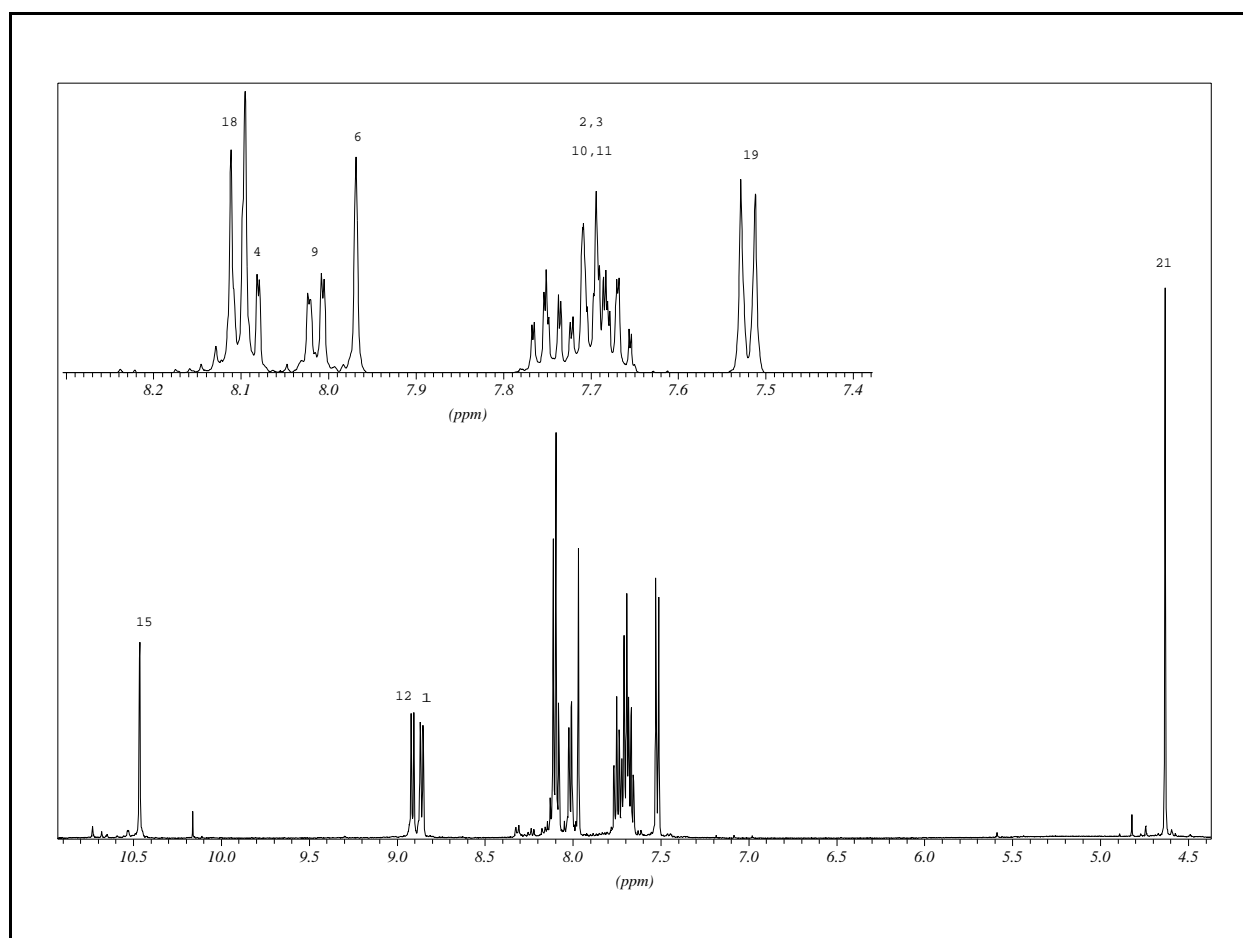


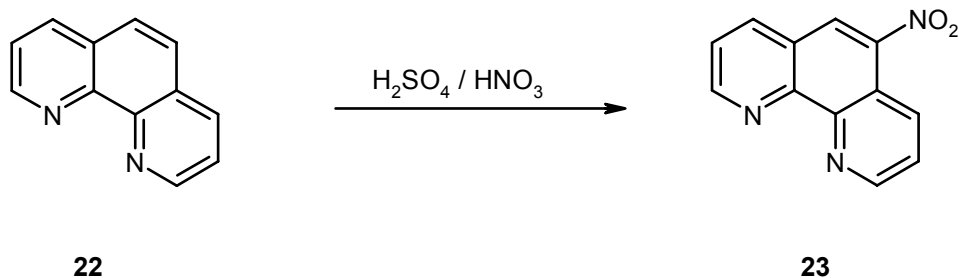
Abbildung 54.:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von **18** in  $\text{DMSO-d}_6$  bei 500 MHz.

$^1\text{H}$ -NMR (500 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 4.62 (s, 2 H, 21-H), 7.52 (d, 2H, 19-H), 7.65-7.77 (m, 4 H, 2-H, 3-H, 10-H, 11-H), 7.97 (s, 1 H, 6-H), 8.01 (d, 1 H, 9-H), 8.08 - 8.11 (m, 3 H, 4-H, 18-H), 8.85 (d, 1 H, 1-H), 8.89 (d, 1 H, 12-H), 10.46 (s, 1 H, 15-H).

$^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$ [ppm] = 62.67 (C-12), 122.84 (C-1), 123.19 (C-12), 123.92 (C-4), 124.04 (C-6), 126.15 (C-19), 126.70, 126.76, 126.98, 127.10 (C-11, C-10, C-2, C-3), 127.67 (C-18), 128.30 (C-9), 128.67 (C-14), 128.82 (C-13), 130.49 (C-5), 131.25 (C-8), 132.20 (C-7), 132.70 (C-17), 146.58 (C-20), 166.49 (C-16).

## 8.10 Synthese Phenac (8)

### 8.10.1 Synthese von 5-Nitro-1,10-phenanthrolin (**23**)<sup>[121]</sup>

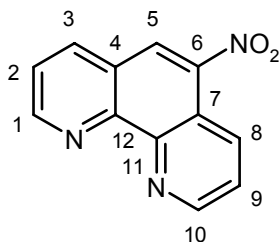


25.0 g (0.14 mmol) 1,10-Phenanthrolin (**22**) wurden in einem Dreihalskolben mit Innenthermometer in 125 mL Oleum (30% SO<sub>3</sub>) gelöst. Zu der orangefarbenen Lösung wurden unter kontrollierten Bedingungen über einen Zeitraum von 30 Minuten 67 mL Salpetersäure (70 %) zugetropft. Nach beendeter Zugabe wurde die Lösung bis zur vollständigen Umsetzung eine Stunde auf 120 °C erhitzt. Nach Abkühlung der Lösung auf Raumtemperatur wurde diese auf 2000 g Eis gegossen und anschließend mit Hilfe einer NaOH-Lösung (30%) auf einen pH-Wert von 7,5 eingestellt. Der ausgefallene hellbraune Feststoff wurde über eine Glasfritte filtriert und nach Trocknung des Rohproduktes aus Ethanol umkristallisiert.

Ausbeute            13.0 g (57.7 mmol) 5-Nitro-1,10-phenanthrolin (**23**), 42 %  
[Lit.<sup>[13]</sup>: 64%]

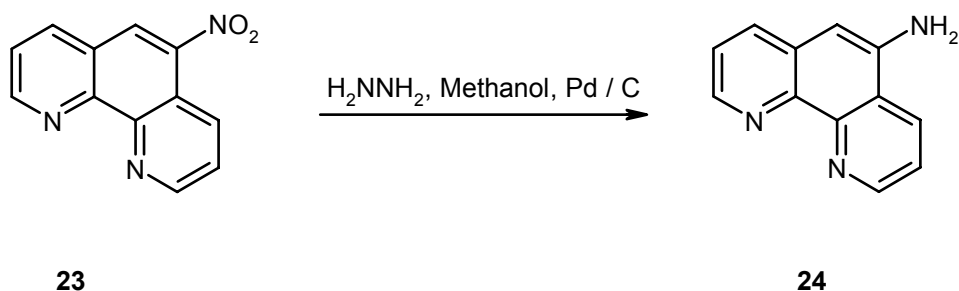
Schmelzpunkt    197 °C, [Lit.<sup>[13]</sup>: 197-198°C]

## Charakterisierung



$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 7.92 (m, 2H, 2-H, 9-H,  $^3\text{J}\{2\text{-H}, 9\text{-H}\} = 8.5$  Hz), 8.74 (dd, 1H, 3-H,  $^3\text{J}\{3\text{-H}, 2\text{-H}\} = 8.5$  Hz,  $^4\text{J}\{3\text{-H}, 1\text{-H}\} = 1.8$  Hz), 8.86 (dd, 1H, 8-H,  $^3\text{J}\{8\text{-H}, 9\text{-H}\} = 8.5$  Hz,  $^4\text{J}\{8\text{-H}, 10\text{-H}\} = 1.8$  Hz), 8.99 (s, 1H, 5-H), 9.21 (dd, 1H, 1-H,  $^3\text{J}\{1\text{-H}, 2\text{-H}\} = 8.5$  Hz,  $^4\text{J}\{1\text{-H}, 3\text{-H}\} = 1.8$  Hz), 9.26 (dd, 1H, 10-H,  $^3\text{J}\{10\text{-H}, 9\text{-H}\} = 8.5$  Hz,  $^4\text{J}\{10\text{-H}, 8\text{-H}\} = 1.8$  Hz).

### 8.10.2 Synthese von 5-Amino-1,10-phenanthrolin (**24**)<sup>[88]</sup>



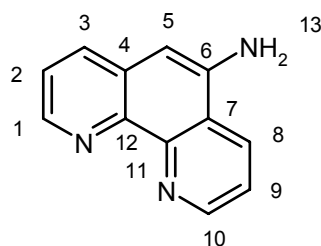
10.0 g (44.0 mmol) 5-Nitro-1,10-phenanthroline (**23**) wurden in 300 mL Methanol suspendiert und mit 2.00 g Pd/C (10%) versetzt. Zu dieser Suspension wurde langsam eine Lösung von 10.0 mL (0.21 mol) Hydrazin-Monohydrat in 100 mL Methanol getropft. Die Suspension wurde 6 h unter Rückfluss erhitzt. Der Umsatz wurde mittels Dünnschichtchromatographie verfolgt (Kieselgel; Chloroform/ Methanol = 7:1 [V/V]). Nach Abkühlung der Lösung auf Raumtemperatur wurde die vorhandene Aktivkohle mittels Filtration über ca. 5 g Celite entfernt. Das Lösungsmittel wurde bis zum Einsetzen der Kristallisation entfernt. Nach Zugabe von 200 mL Wasser wurde die

Lösung zur Kristallisation über Nacht in den Kühlschrank gestellt. Der ausgefallene Feststoff wurde abfiltriert und im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Ausbeute 6.30 g (29.1 mmol) 5-Amino-1,10-phenanthrolin (**24**), 73 %  
[Lit.<sup>[14]</sup>: 76%]

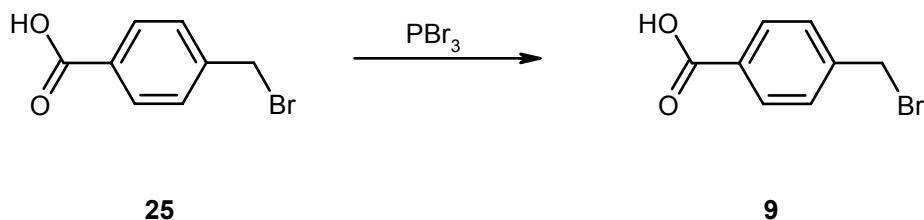
Schmelzpunkt: 261°C [Literaturschmelzpunkt<sup>[14]</sup>: 259°C]

Charakterisierung



<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ [ppm] = 6.16 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 6.86 (s, 1H, 5-H), 7.49 (dd, 1H, 2-H, <sup>3</sup>J{2-H, 1-H} = 4.2 Hz, <sup>3</sup>J{2-H, 3-H} = 4.2 Hz), 7.72 (dd, 1H, 9-H, <sup>3</sup>J{9-H, 10-H} = 4.2 Hz, <sup>3</sup>J{9-H, 8-H} = 4.2 Hz), 8.03 (d, 1H, 3-H, <sup>3</sup>J{3-H, 2-H} = 4.2 Hz), 8.67 (m, 2H, 1-H, 8-H <sup>3</sup>J{1-H, 2-H} = 4.2 Hz, <sup>3</sup>J{8-H, 9-H} = 4.2 Hz), 9.04 (m, 1H, 10-H, <sup>3</sup>J{10-H, 9-H} = 4.2 Hz).

### 8.10.3 Synthese von 4-Brommethyl-benzoesäurebromid (**9**)<sup>[89]</sup>



5.00 g (23.0 mmol) 4-Brom-p-toloylcarbonsäure (**25**) wurden in 14.0 mL (0.15 mol) Phosphortribromid suspendiert und 3 Stunden unter Rückfluss erhitzt. Die überstehende



Lösung wurde abdekantiert und im Ölpumpenvakuum von flüchtigen Bestandteilen befreit. Nach Aufnahme des Produktes in 20 mL Toluol wurde der zurückbleibende Feststoff abfiltriert und das Filtrat im Ölpumpenvakuum bis zur Trockene eingengt. Das Produkt **5** wurde als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute 5.00 g (12.9 mmol) 4-Brommethyl-benzoesäurebromid (**9**), 78%  
[Lit.<sup>[15]</sup>: 79%]

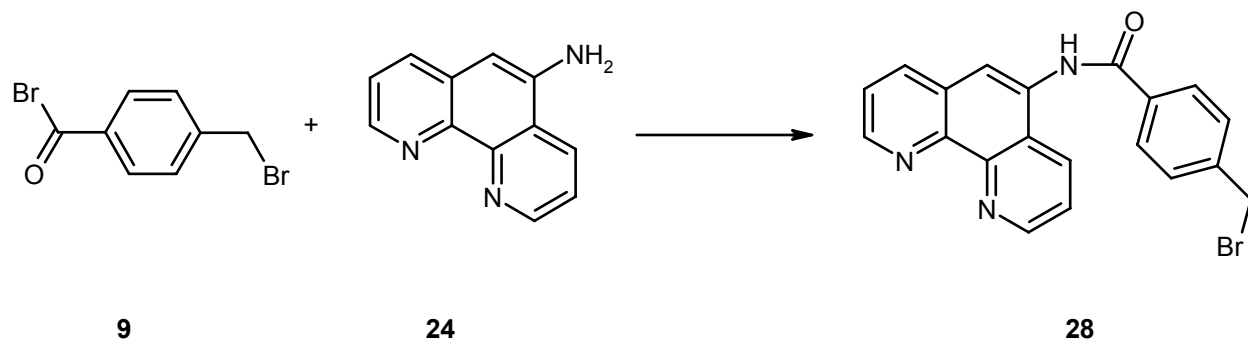
Schmelzpunkt 58 °C, [Lit.<sup>[15]</sup> : 58.5 °C]

Charakterisierung

IR(KBr):  $\tilde{\nu}$  (cm<sup>-1</sup>) = 3000 (CH<sub>arom.</sub>), 2875 (CH<sub>aliph.</sub>), 1750 (CO), 838 (CH<sub>arom.</sub>), 787 (C-Br).

<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C-NMR-Spektren waren aufgrund der geringen Beständigkeit des Produktes nicht zugänglich.

#### 8.10.4 Synthese von 4-(Brommethyl)-*N*-(1,10-phenanthrolin-5-yl)benzamid (**28**)<sup>[13]</sup>



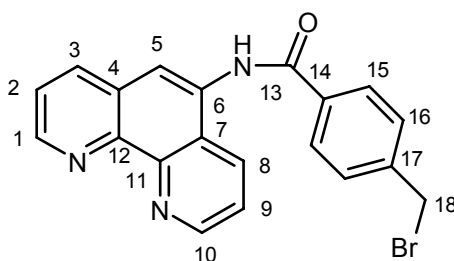
Zu einer Suspension von 1.50 g ( 8.00 mmol) 5-Amino-1,10-phenanthrolin (**24**) in 100 mL Acetonitril wurde eine Lösung von 2.40 g Säurebromid **9** in 50 mL Acetonitril getropft und anschließend 50 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Abfiltrieren des Niederschlages wurde aufeinanderfolgend mit Acetonitril (2 mal 10 mL), 5% wässriger

Natriumhydrogencarbonat-Lösung (2 mal 10 mL) und 100 mL Wasser gewaschen. Die Trocknung erfolgte im Ölpumpenvakuum bei 50 °C.

Ausbeute 2.25 g (82 mmol) 4-(Brommethyl)-*N*-(1,10-phenanthrolin-5-yl)benzamid (**28**), 81% [Lit.<sup>[17]</sup>: 88%]

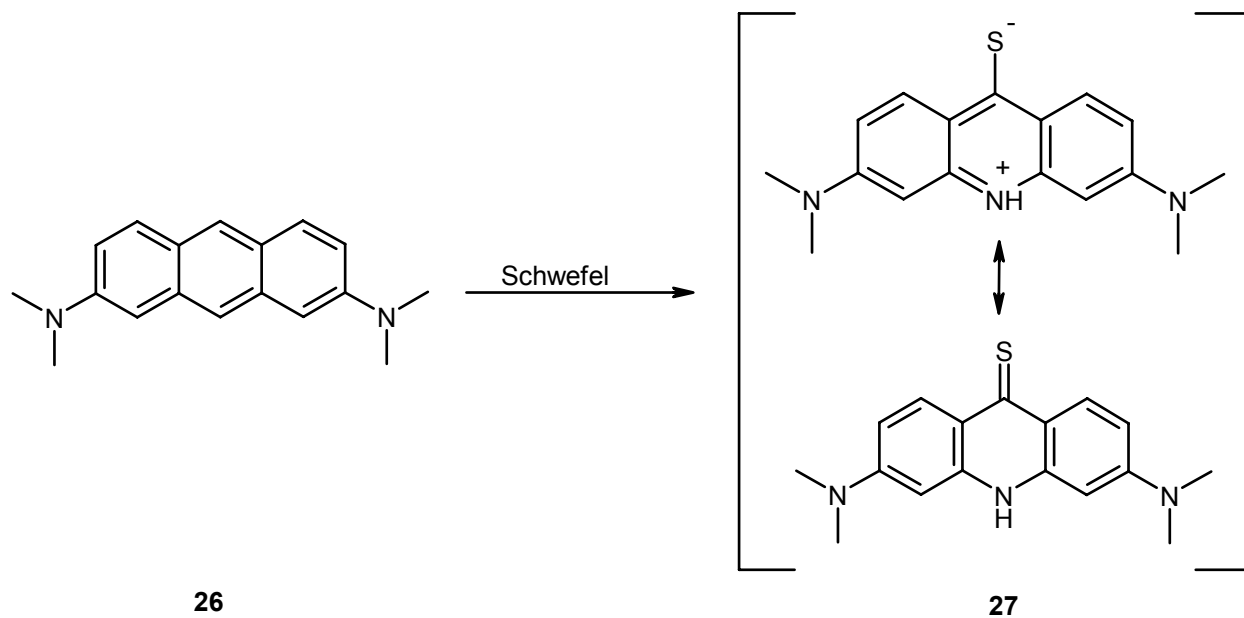
Schmelzpunkt 229°C [Lit.<sup>[17]</sup>: 230°C]

Charakterisierung:



<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ [ppm] = 4.81(s, 2H, 18-H), 7.65 (d, 2H, 16-H, <sup>3</sup>J{16-H, 15-H} = 8.1 Hz, 7.92 (m, 2H, 12-H, 9-H), 8.10 (d, 2H, 15-H, <sup>3</sup>J{15-H, 16-H} = 8.1 Hz), 8.28 (s, 1H, 5-H), 8.73 (m, 2H, 3-H, 8-H, <sup>3</sup>J{3-H, 2-H} = 8.5 Hz), 9.14 (dd, 1H, 10-H, <sup>3</sup>J{10-H, 9-H} = 3.5 Hz, <sup>4</sup>J{10-H, 8-H} = 1.5 Hz), 9.19 (dd, 1H, 1-H, <sup>3</sup>J{1-H, 2-H} = 3.5 Hz, <sup>4</sup>J{1-H, 3-H} = 1.5 Hz), 10.81 (s, 1H, NH).

### 8.10.5 Darstellung von 3,6-Bis(dimethylamino)-9(10H)-acridinthion (**27**)<sup>[90]</sup>



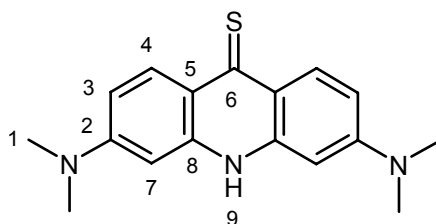
5.00 g (18.8 mmol) Acridin Orange (**26**) wurden mit 0.18 g (18.8 mmol) Schwefel gemischt und gemörst. Die Mischung wurde in einem 250 mL Einhalskolben auf 205°C erhitzt und 45 Minuten bei dieser Temperatur gehalten. Der Feststoff schmolz bei ca. 180°C und es ergab sich eine dunkelbraune Schmelze.

Die Schmelze wurde bis auf Raumtemperatur abgekühlt und gemörst. Es wurde in 50 mL heißem DMF umkristallisiert. Die erhaltenen braunen Kristalle mit violetterm Glanz wurden im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Ausbeute                    4.10 g (13.8 mmol) 3,6-Bis(dimethylamino)-9(10H)-  
Acridinthion (**27**), 73% (Lit.<sup>[16]</sup>: 83%)

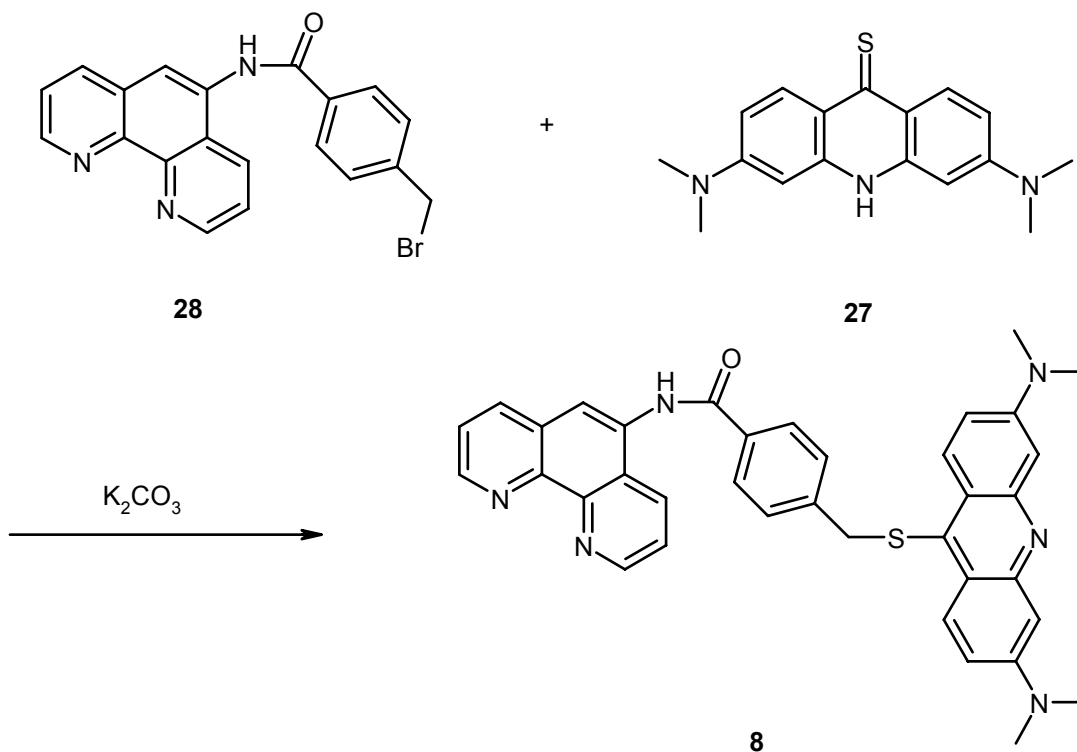
Schmelzpunkt            358°C (Zersetzungspunkt) (Lit.<sup>[16]</sup>: 360-361°C)

Charakterisierung:



<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) :  $\delta$  [ppm] = 3.12 (s, 12H, 1-H), 6.49 (s, 2H, 7-H), 6.89 (d, 2H, 3-H, <sup>3</sup>J{3-H, 4-H} = 9.3 Hz), 8.81 (d, 2H, 4-H, <sup>3</sup>J{4-H, 3-H} = 9.3 Hz), 11.64 (s, 1H, NH).

#### 8.10.6 Synthese von 4{[3,6-bis(dimethylamino)acridin-9-yl]thio}methyl}-N-(1,10-phenanthrolin-5-yl)benzamid (8)<sup>[122]</sup>



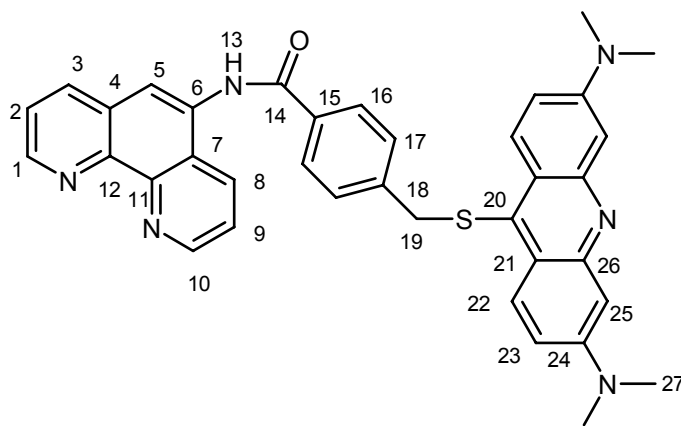
0.785 g (2.00 mmol) **28** wurden in 50 mL Dimethylformamid suspendiert und zusammen mit 0.595 g (2.00 mmol) **27** und 0.28 g (2.00 mmol) Kaliumcarbonat für 30 Minuten im Ultraschallbad belassen. Im Anschluß wurde die Reaktionsmischung bei 80°C drei

Stunden erwärmt. Nach Abkühlung des Reaktionsgemisches auf Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel mittels Filtration vom Feststoff abgetrennt. Der Feststoff wurde zu Entfernung des restlichen Dimethylformamids mit 30 mL Wasser versetzt und 30 Minuten ins Ultraschallbad eingebracht. Nach Filtration wurde das Produkt im Exsikkator getrocknet. Die Reinigung erfolgte durch zweimalige Umkristallisation in Ethanol (ca. 15 mL). Da sich nicht das gesamte Rohprodukt in der vorgegebenen Menge Ethanol löste, wurde der unlösliche Feststoff in der Hitze abfiltriert.

Ausbeute: 0.31 g (0.51 mmol), 4[[3,6-bis(dimethylamino)acridin-9-yl]thio]methyl}-N-(1,10-phenanthrolin-5-yl)benzamid (**8**), 25%.

Schmelzpunkt: oberhalb 150°C Zersetzung

Charakterisierung



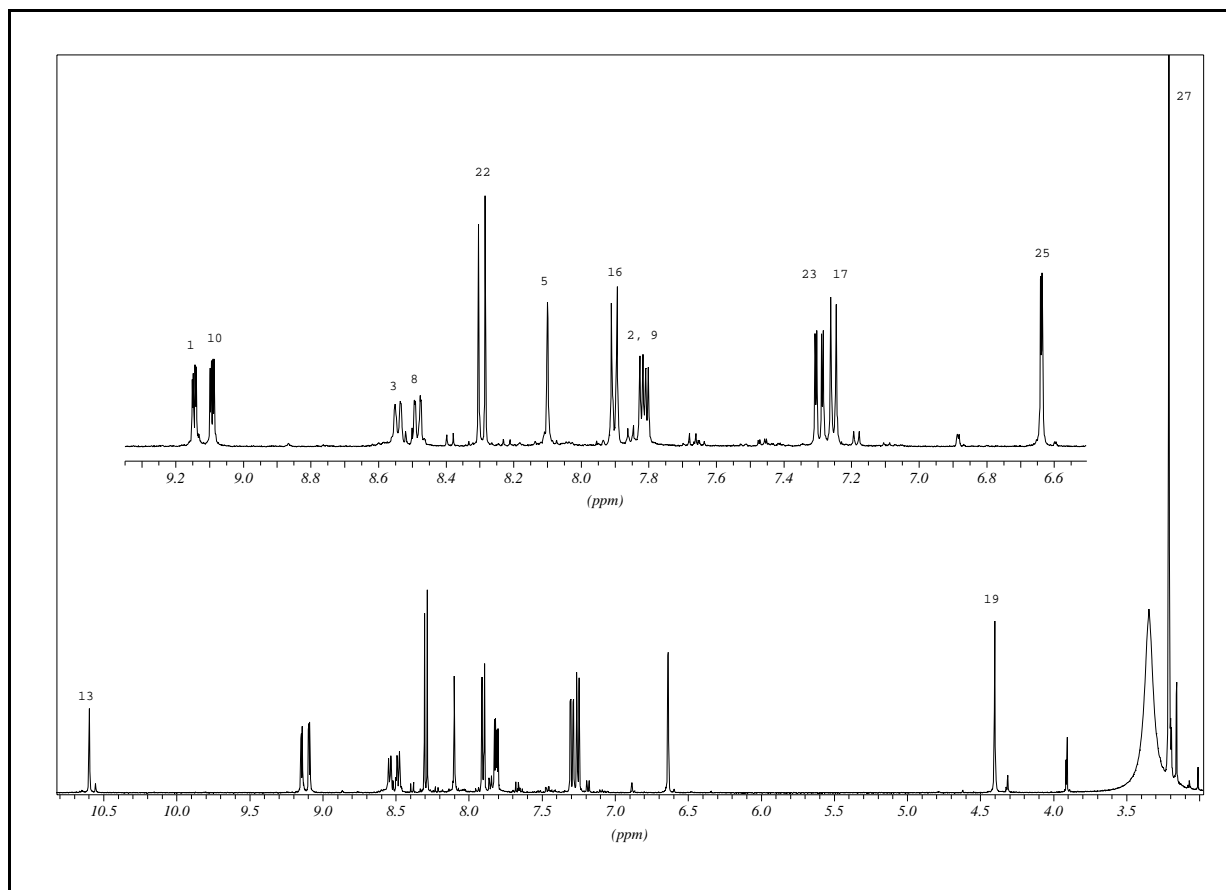


Abbildung 55.:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von **8** in  $\text{DMSO-d}_6$  bei 500 MHz.

$^1\text{H}$ -NMR (500 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 3.18 (s, 12H, 27-H), 4.37 (s, 2H, 19-H), 6.73 (d, 2H, 25H,  $^4J\{25\text{-H}, 23\text{-H}\} = 2.3$  Hz), 7.22 (d, 2H, 17-H,  $^3J\{17\text{-H}, 16\text{-H}\} = 8.25$  Hz, 7.24 (dd, 2H, 23-H,  $^3J\{23\text{-H}, 22\text{-H}\} = 9.70$  Hz,  $^4J\{23\text{-H}, 25\text{-H}\} = 2.3$  Hz), 7.78 (m, 2H, 2-H, 9-H), 7.90 (d, 2H, 16-H),  $^3J\{16\text{-H}, 17\text{-H}\} = 8.25$  Hz, 8.06 (s, 1H, 5-H), 8.23 (d, 2H, 22-H,  $^3J\{22\text{-H}, 23\text{-H}\} = 9.70$  Hz), 8.44 (dd, 1H, 8-H,  $^3J\{8\text{-H}, 9\text{-H}\} = 13.4$  Hz,  $^4J\{8\text{-H}, 10\text{-H}\} = 1.65$  Hz), 8.49 (dd, 1H, 3-H,  $^3J\{3\text{-H}, 2\text{-H}\} = 8.32$  Hz,  $^4J\{3\text{-H}, 1\text{-H}\} = 1.65$  Hz), 9.06 (dd, 1H, 1-H,  $^3J\{1\text{-H}, 2\text{-H}\} = 4.28$  Hz,  $^4J\{1\text{-H}, 3\text{-H}\} = 1.80$  Hz), 9.11 (dd, 1H, 10-H,  $^3J\{10\text{-H}, 9\text{-H}\} = 4.2$  Hz,  $^4J\{10\text{-H}, 8\text{-H}\} = 1.65$  Hz), 10.63 (s, 1H, 13-H).

$^{13}\text{C}$ -NMR (125.73 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 39.5 (C-27), 41.06 (C-19), 92.66 (C-25), 115.03 (C-23), 118.78 (C-24), 122.72 (C-5), 122.96 (C-14), 123.65 (C-2, C-9), 125.68 (C-6), 127.88 (C-16), 128.78 (C-17), 129.24 (C-22), 132.04 (C-16), 128.78 (C-17),

129.24 (C-22), 136.13 (C-3), 141.11 (C-15), 144.06 (C-4), 145.61 (C-7), 149.32 (C-20),  
149.73 (C-10), 149.95 (C-1), 153.98 (C-21), 166.01 (C-13).

Massenspektroskopie: hochaufgelöstes Spektrum (ESI, positive ion mode in  
Methanol, 10  $\mu$ M)

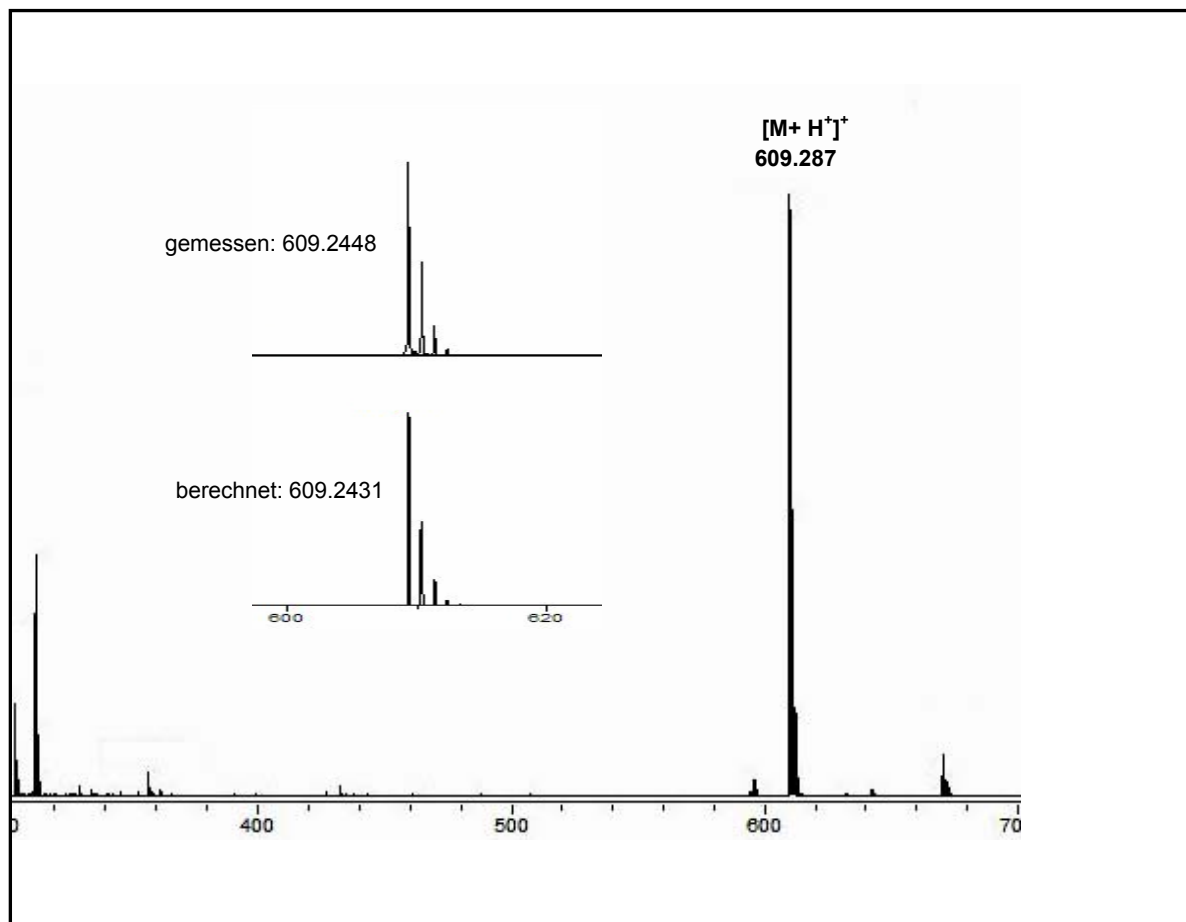


Abbildung 56.: hochaufgelöstes Massenspektrum von **8**

berechnete monoisotopische Masse für  $C_{37}H_{33}N_6OSH$   $[M + H]^+$ : 609.2431

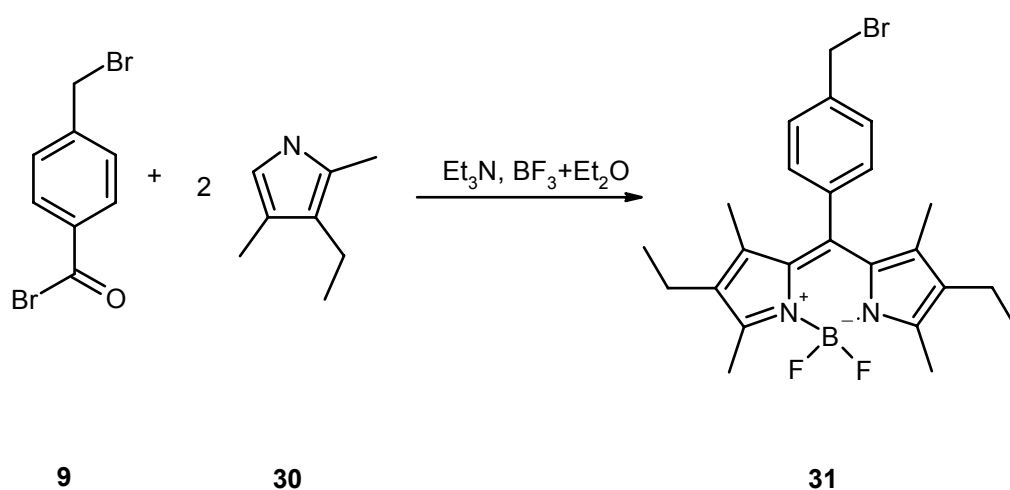
gemessen: 609.2448

Abweichung: 1.7 ppm

## 8.11 Synthese BODIPYs

### 8.11.1 Synthese BODIPY 1 (31)

#### 8.11.1.1 Synthese von 8-(4-Benzoylbromid)-4,4'-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-2,6-dimethyl-4-bor-3a, 4a-diaza-s-indacen (31)



Zu einer Lösung aus 2.66 g (18.0 mmol) 2,4-Dimethyl-3-ethylpyrrol (**30**) in 800 mL Dichlormethan wurden in einem Zeitraum von 10 Minuten eine Lösung aus 2.50 g (9.00 mmol) 4-Brommethyl-benzoylbromid (**9**) getropft. Die dunkelrote Reaktionslösung wurde nach 15 minütigem Rühren bei Raumtemperatur vom Lösungsmittel befreit und erneut in 20 mL Dichlormethan gelöst. Nach der Zugabe von 3.85 g (38.0 mmol) Triethylamin färbte sich die Reaktionslösung orange. Nach 30 Minuten bei Raumtemperatur wurden 8.00 g (57.0 mmol) Bortrifluoreiddiethyletherat-Lösung zugesetzt. Die dunkelrote Reaktionslösung wurde nun zwei Stunden bei 50°C gerührt und danach bis auf ein Volumen von 10 mL vom Lösungsmittel befreit. Die Reinigung erfolgte über Säulenchromatographie. Dazu wurde die gesamte Reaktionslösung auf eine Säule (Länge: 30 cm, Durchmesser: 5 cm) mit Kieselgel als stationäre Phase gegeben. Hexan, Ethylacetat in einem Verhältnis von 5 / 2 lieferte eine an Produkt angereicherte Fraktion.



Dieses Rohprodukt wurde erneut, bei gleichen Bedingungen säulenchromatographisch gereinigt.

Ausbeute: 1.28 g (2.7 mmol), 8-(4-Benzoylbromid)-4,4'-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-2,6-dimethyl-4-bor-3a, 4a-diaza-s-indacen (**31**), 30%

Schmelzpunkt: > 125°C Zersetzung

Charakterisierung:

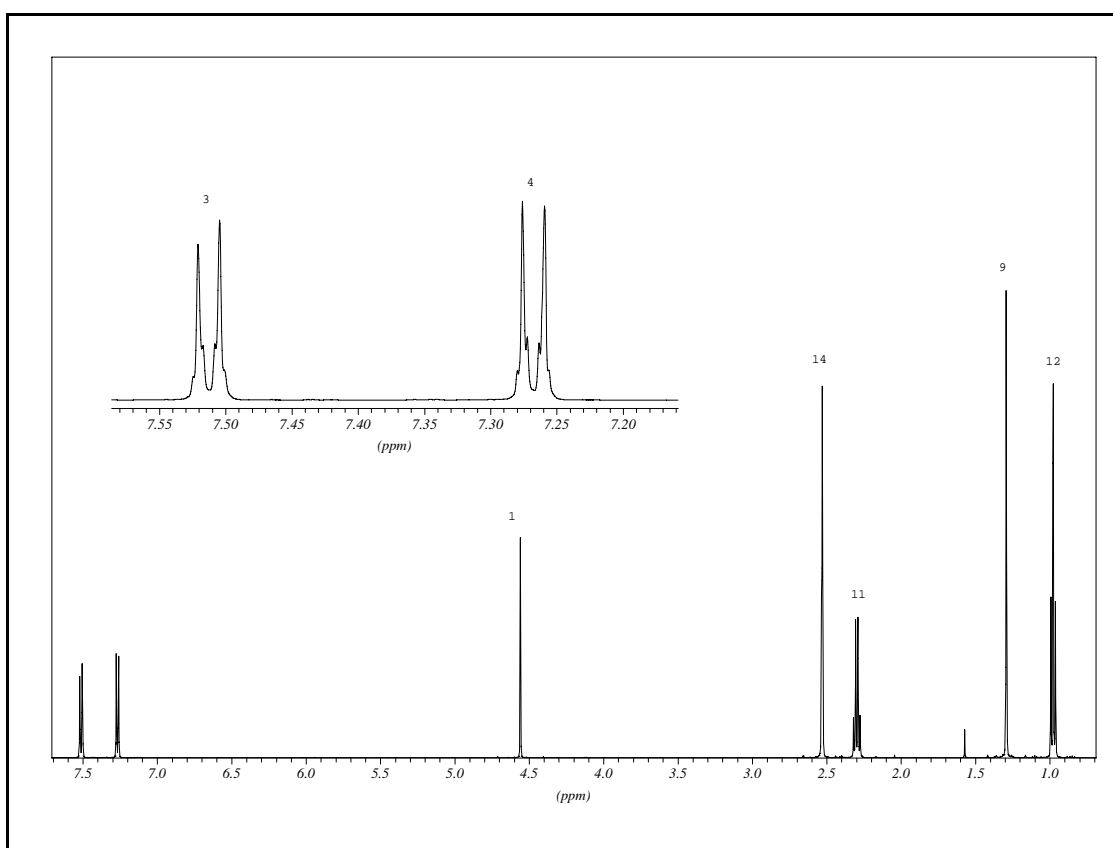
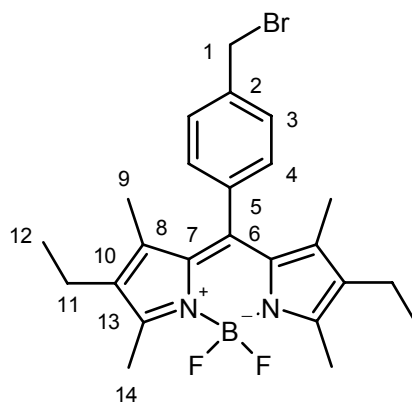


Abbildung 57.:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von **31** in  $\text{DMSO-d}_6$  bei 500 MHz.

$^1\text{H}$ -NMR (500 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 0.98 (t, 6H, 12-H), 1.29 (s, 6H, 9-H), 2.30 (m, 6H, 11-H), 4.56 (s, 2H, 1-H), 7.26 (m, 2H, 4-H,  $^3\text{J}\{4\text{-H}, 3\text{-H}\} = 3.2$  Hz), 7.51 (m, 2H, 3-H,  $^3\text{J}\{3\text{-H}, 4\text{-H}\} = 3.2$  Hz).

$^{13}\text{C}$ -NMR (125.73 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta[\text{ppm}] = 11.90$  (C-14), 12.63 (C-9), 14.72 (C-12), 17.19 (C-11), 32.85 (C-13), 128.91 (C-4), 129.82 (C-3), 130.78 (C-5), 133.03 (C-10), 136.07 (C-2), 138.38 (C-6), 138.96 (C-8), 139.47 (C-7), 154.04 (C-13).

Massenspektroskopie: hochaufgelöstes Spektrum (ESI, positive ion mode in Methanol, 10  $\mu$ M)

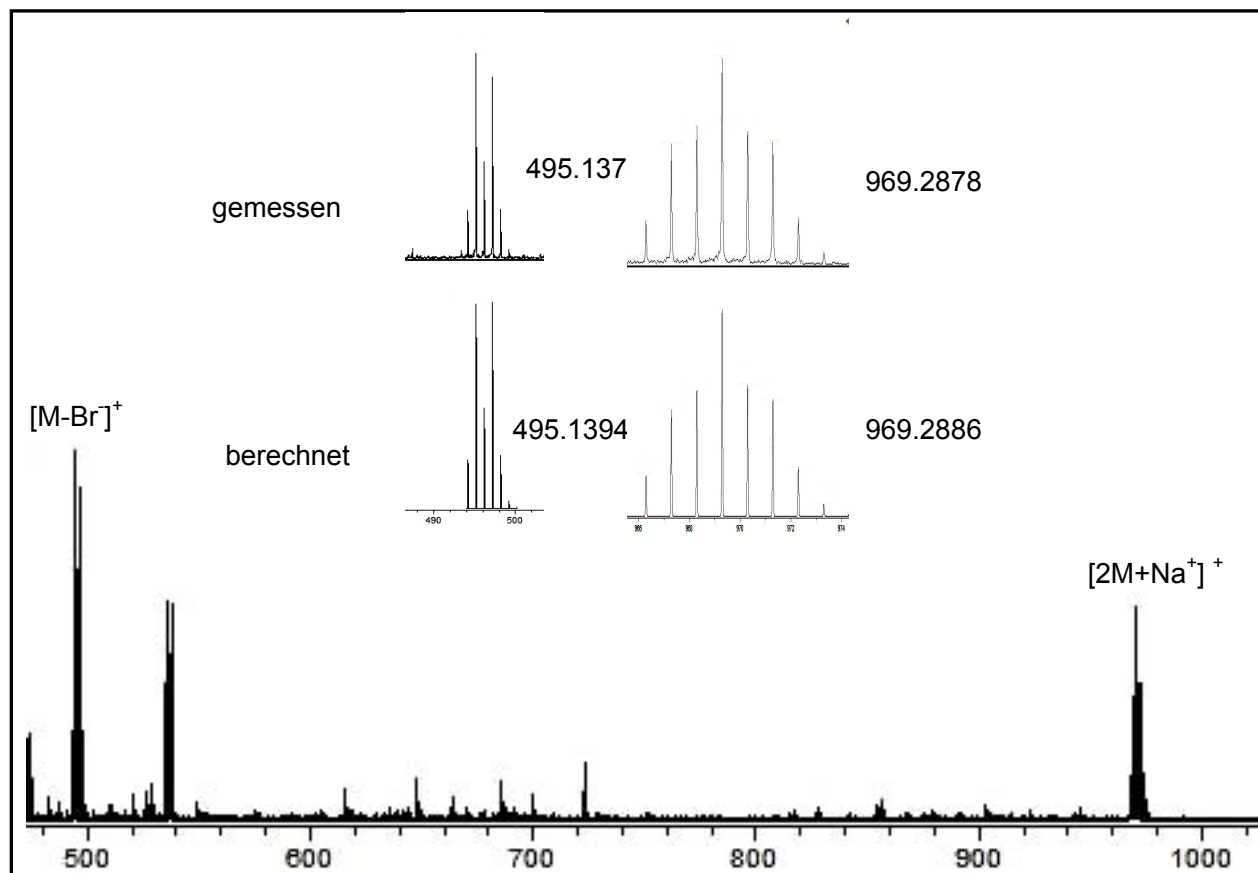


Abbildung 58.: hochaufgelöstes Massenspektrum von **31**

berechnete monoisotopische Masse für $C_{24}H_{28}BBrF_2N_2Na$ $[M - Br]^+$ :	495.1394
gemessen:	495.1374
Abweichung:	2 ppm
berechnete monoisotopische Masse für das Dimere $(C_{22}H_{28}BBrF_2N_2)_2Na$ $[2M+Na]^+$ :	969.2886
gemessen:	969.2878
Abweichung:	0.8 ppm



Charakterisierung:

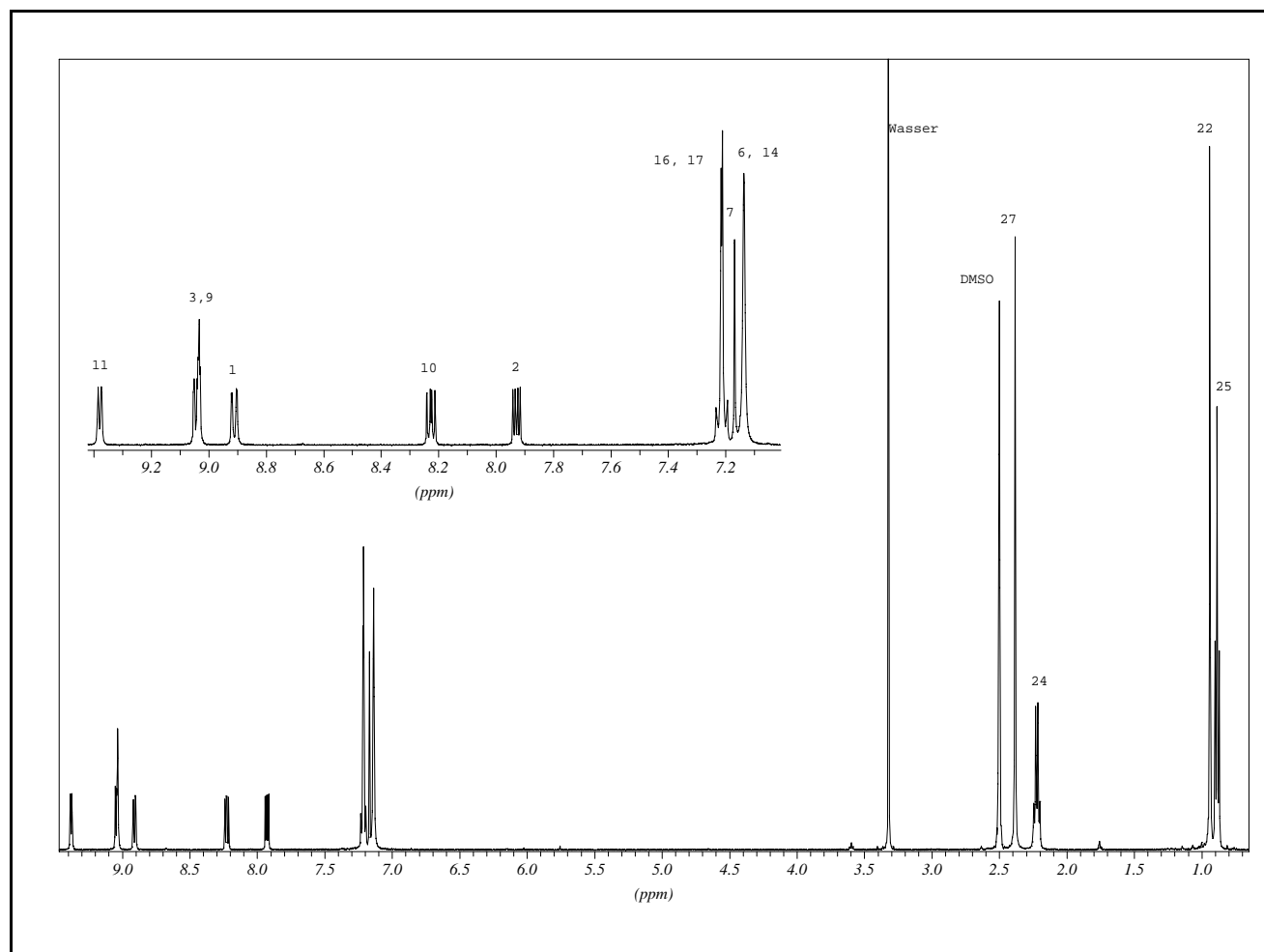
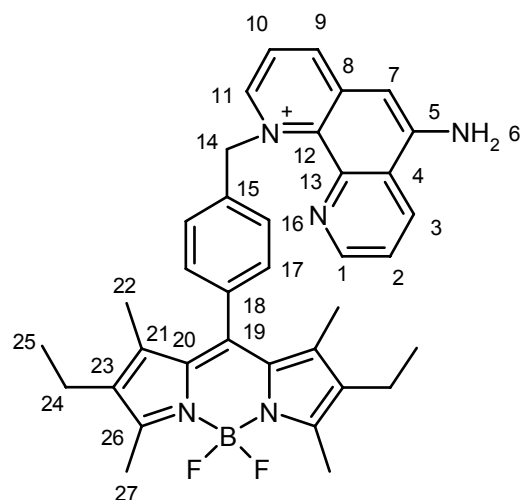


Abbildung 59.:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von **32** in  $\text{DMSO-d}_6$  bei 500 MHz.

$^1\text{H}$ -NMR (500 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ ):  $\delta$  [ppm] 0.89 (t, 6H, 25-H,  $^3J\{25\text{-H}, 24\text{-H}\} = 7.5\text{Hz.}$ ), 0.94 (s, 6H, 22-H), 2.21 (q, 4H, 24-H,  $^3J\{24\text{-H}, 25\text{-H}\} = 7.5\text{ Hz}$ ), 2.38 (s, 6H, 27-H), 7.14 (s, 4H, 6-H, 14-H), 7.17 (s, 1H, 7-H), 7.21 (m, 4H, 16-H, 17-H), 7.93 (q, 1H, 2-H,  $^3J\{2\text{-H}, 1\text{-H}\} = 8.5\text{ Hz.}$ ), 8.20 (dd, 1H, 10-H,  $^3J\{10\text{-H}, 11\text{-H}\} = 5.0\text{ Hz.}$ ), 8.91 (d, 1H, 1-H,  $^3J\{1\text{-H}, 2\text{-H}\} = 8.5\text{ Hz.}$ ), 9.03 (m, 2H, 3-H, 9-H), 9.38 (d, 1H, 11-H,  $^3J\{11\text{-H}, 10\text{-H}\} = 5.0\text{ Hz.}$ ).

$^{13}\text{C}$ -NMR (125.73 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 11.06 (C-22), 12.18 (C-27), 14.46 (C-25), 16.03 (C-24), 66.02 (C-14), 101.05 (C-7), 123.41 (C-4), 123.82 (C-2), 124.15 (C-10), 126.88 (C-16), 128.14 (C-17), 129.32 (C-8), 129.79 (C-20), 131.14 (C-1), 132.85 (C-23), 133.57 (C-18), 135.48 (C-19), 137.78 (C-21), 138.03 (C-15), 139.69 (C-13), 139.87 (C-12), 143.86 (C-9), 146.21 (C-11), 146.54 (C-5), 148.86 (C-3), 153.17 (C-17).

Massenspektroskopie: hochaufgelöstes Spektrum (ESI, positive ion mode in Methanol, 10  $\mu$ M)

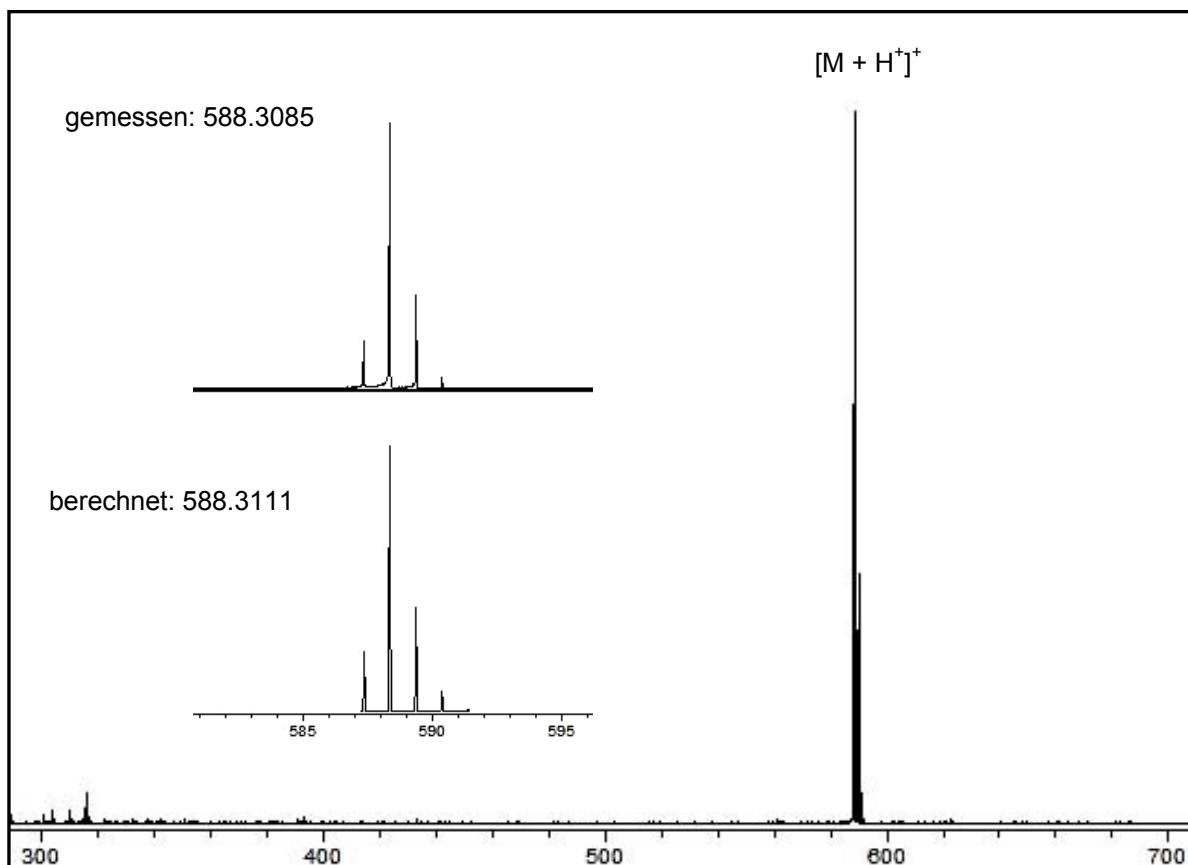


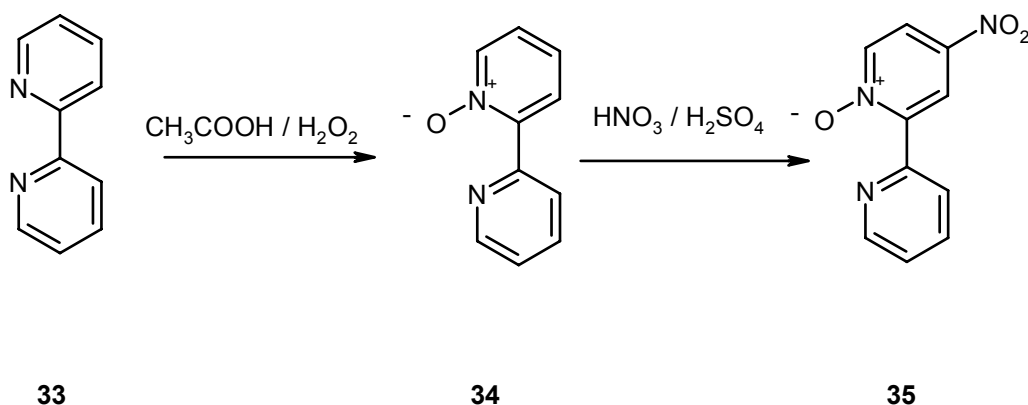
Abbildung 60.: hochaufgelöstes Massenspektrum von **32**

berechnete monoisotopische Masse für $C_{36}H_{36}BF_2N_5H$ $[M + H]^+$ :	588.3111
gemessen:	588.3085
Abweichung:	2.6 ppm



### 8.11.2 Synthese BODIPY 2 (37)

#### 8.11.2.1 Synthese von 4-Nitro-2,2'-bipyridin-1-oxid (35)<sup>[123]</sup>



Zu einer Lösung von 20.3 g (0.13 mol) 2,2'-Dipyridyl (**34**) in 102 mL Eisessig wurden bei Raumtemperatur und unter Rühren 16.0 mL (0.141 mol) 30proz. Wasserstoffperoxidlösung getropft. Bei einer Temperatur von 70°C wurde die Mischung 18 Stunden gerührt und nach Abkühlung auf Raumtemperatur mit 3.50 mL Hydrazin-Monohydrat versetzt um restliches Wasserstoff-peroxid zu zerstören. Die Reaktionslösung wurde am Rotationsverdampfer von allen flüchtigen Bestandteilen befreit und das Rohprodukt (**35**) in Form eines hellgelben Öls erhalten, welches direkt in die nachfolgende Nitrierung eingesetzt wurde.

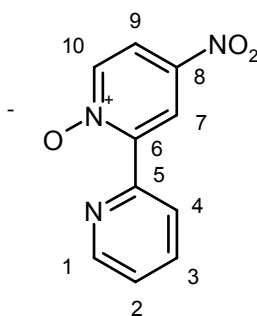
Das Rohprodukt wurde in einem Eis/Viehsalz-Bad auf eine Temperatur von -15 °C abgekühlt und mit 54.0 mL konzentrierter Schwefelsäure versetzt. Zu der orangefarbenen Lösung wurde unter Kühlung und unter Rühren ein Gemisch von 80 mL rauchender Salpetersäure und 54.0 mL konzentrierter Schwefelsäure sehr vorsichtig zugetropft. Die Reaktionslösung wurde noch 30 Minuten bei Raumtemperatur und danach zwei Stunden bei 100 °C gerührt. Nach dem Abkühlen wurde die Mischung auf 400 g Eis gegossen und der pH-Wert wurde mit 10.0proz. Natriumhydroxidlösung auf

einen pH-Wert von 5.5 eingestellt. Das anfallende beigefarbene Rohprodukt wurde abfiltriert, getrocknet und aus 35.0 mL Chloroform umkristallisiert.

Ausbeute: 4.24 g (1.95 mmol), 4-Nitro-2,2'-bipyridin-1-oxid (**36**), 15%,  
[Lit<sup>[123]</sup>:17%]

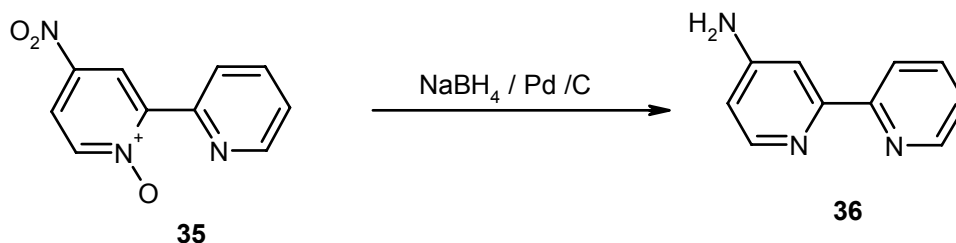
Schmelzpunkt: 182°C, [Lit<sup>[123]</sup>:183-185°C]

Charakterisierung:



<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 7.38 (m, 1 H, 2-H), 7.88 (m, 1 H, 3-H), 8.08 (dd, 1 H, 9-H), 8.38 (d, 1 H, 10-H), 8.80 (m, 1 H, 1-H), 8.91 (m, 1 H, 4-H), 9.14 (d, 1 H, 7-H).

### 8.11.2.2 Synthese von 2,2'-Bipyridin-4-amin (**36**)<sup>[123]</sup>

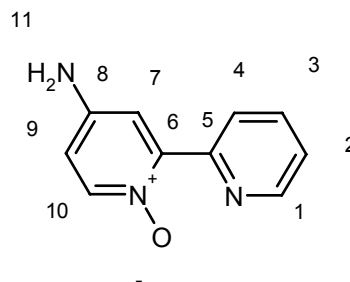


Zu einer Lösung von 4.00 g (18.4 mmol) 4-Nitro-2,2'-bipyridin-1-oxid (**36**) in 0.80 L Methanol wurden unter Schutzgasatmosphäre 0.84 g Palladium auf Aktivkohle (10 % Pd) gegeben. Nach dem Abkühlen der Suspension im Eisbad auf 0°C wurde unter Rühren 7.30 g (192 mmol) Natriumborhydrid zugesetzt. Die Reaktionsmischung wurde im Anschluss drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Filtration der Suspension über 100 g Celite wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der gelbe Rückstand wurde in 200 mL Wasser aufgenommen und die wässrige Lösung drei mal mit je 100 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Nach der Umkristallisation in 500 mL Cyclohexan wurde das Produkt in Form hellgelber Nadeln erhalten.

Ausbeute: 2.50 g (14.6 mmol), 2,2'-Bipyridin-4-amin (**37**), 80%, [Lit.<sup>[123]</sup>: 91%]

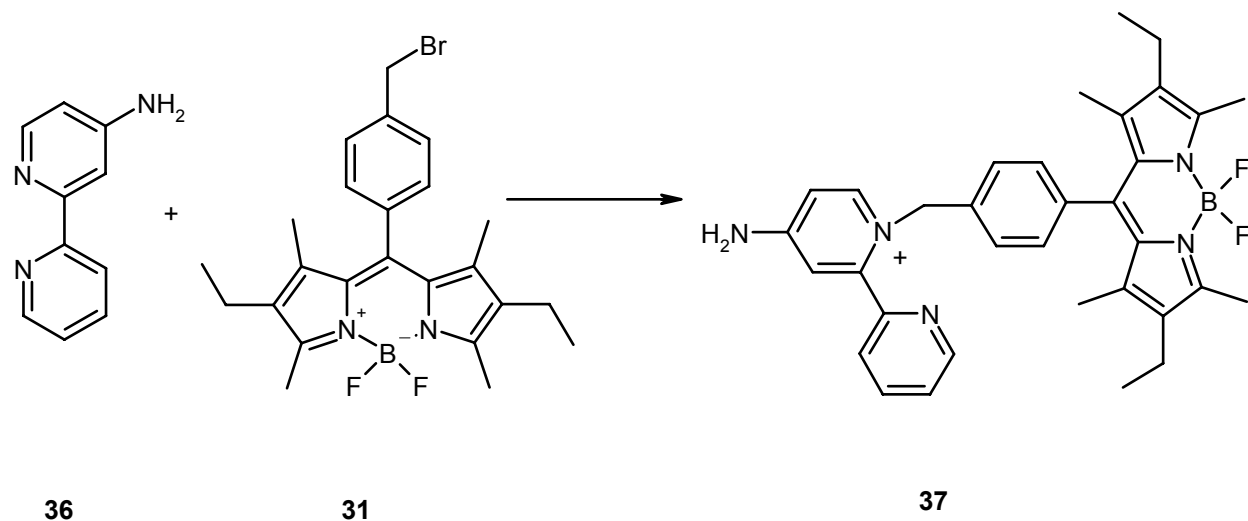
Schmelzpunkt: 125°C, [Lit.<sup>[123]</sup>: 127-129°C]

Charakterisierung:



$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 4.25 (s, 1H, 11-H), 6.55 (m, 1 H, 9-H), 7.27 (m, 1 H, 2-H), 7.66 (m, 1 H, 7-H), 7.79(m, 1 H, 3-H), 8.30-8.35 (m, 2 H, 10-H, 4-H), 8.65 (m, 1 H, 1-H).

### 8.11.2.3 Synthese von 8-(4'-Amino-1-benzyl-[2,2']-bipyridinyl-1-ium)-4,4'-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-2,6-dimethyl-4-bor-3a,4a-diaza-s-indacen (37)



79.0 mg (0.50 mmol) 4-Amino-2,2'-bipyridyl (36) wurden zusammen mit 0.24 g (0.50 mmol) des Fluorophors **31** und 35.0 mg (0.25 g) fein gemörstertes Kaliumcarbonat in 50.0 mL Chloroform 16 Stunden unter Rückfluß erwärmt. Nachdem das Lösungsmittel entfernt wurde, erfolgte die Reinigung mit Hilfe einer Säulenchromatographie über 20 g Aluminiumoxid<sub>neutral</sub>. Als Laufmittel diente ein Lösungsmittelgemisch aus Dichlormethan / Hexan / Ethanol im Verhältnis von 6 / 4 / 1. Das Produkt fiel in Form eines roten Öls an.

Ausbeute: 33.8 mg (0.06 mmol), **37**, 12%.

Charakterisierung:

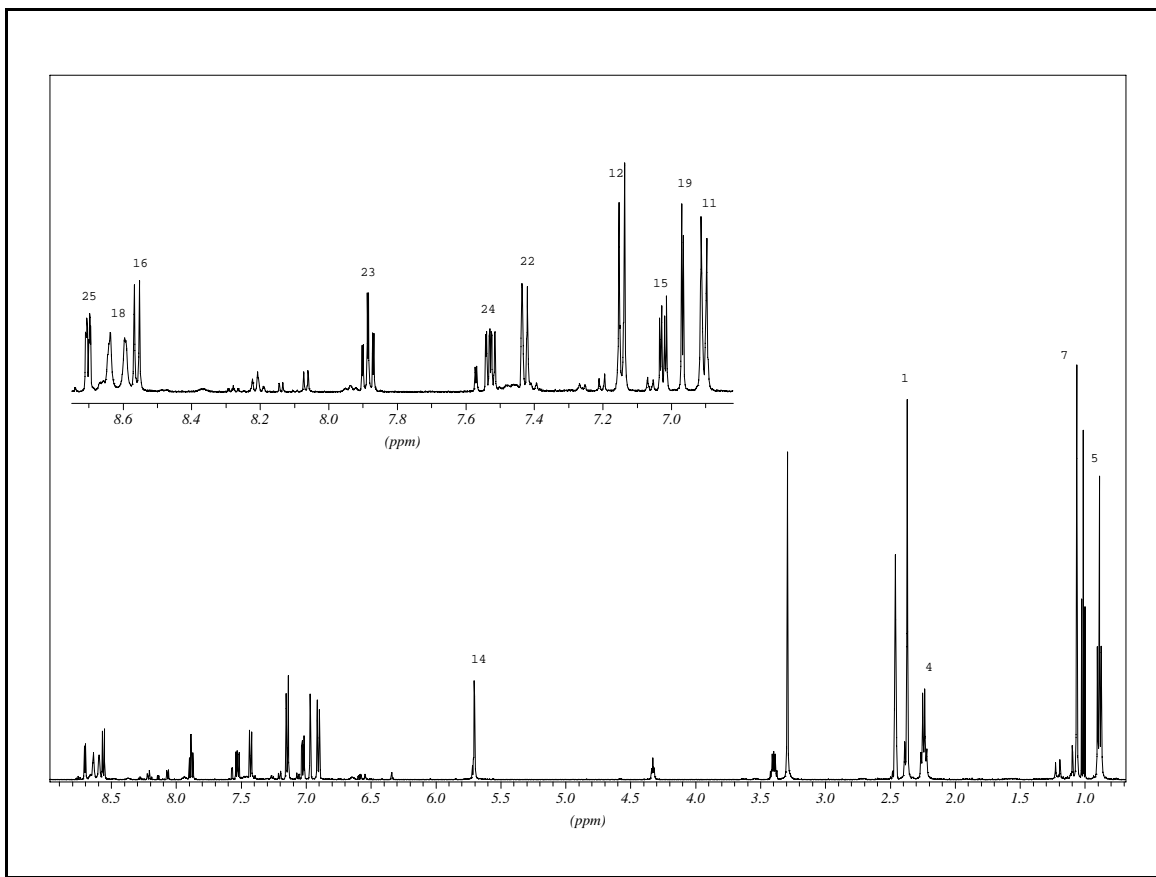
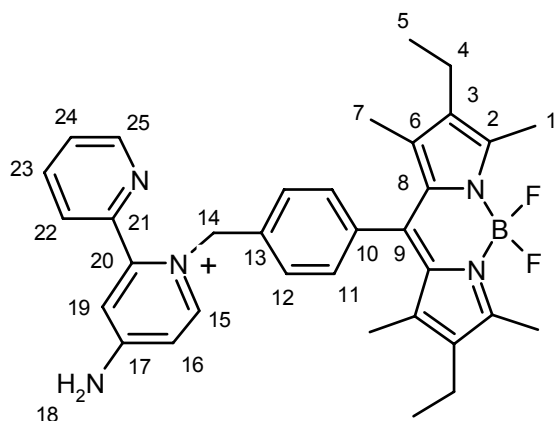


Abbildung 61.: <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von **37** in DMSO-d<sub>6</sub> bei 500 MHz.

$^1\text{H}$ -NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$ [ppm] 0.85 (t, 6H, 5-H,  $^3J\{5\text{-H}, 4\text{-H}\} = 7.45\text{Hz.}$ ), 1.06 (s, 6H, 7-H), 2.24 (q, 4H, 4-H,  $^3J\{4\text{-H}, 5\text{-H}\} = 7.45\text{ Hz}$ ), 2.34 (s, 6H, 1-H), 5.70 (s, 2H, 14-H), 6.90 (d, 2H, 11-H,  $^3J\{11\text{-H}, 12\text{-H}\} = 8.25\text{ Hz}$ ), 6.97 (m, 1H, 19-H), 7.02 (m, 1H, 15-H,  $^3J\{15\text{-H}, 16\text{-H}\} = 7.35\text{ Hz.}$ ), 7.14 (d, 2H, 12-H,  $^3J\{12\text{-H}, 11\text{-H}\} = 8.25\text{ Hz}$ ), 7.42 (d, 1H, 22-H,  $^3J\{22\text{-H}, 23\text{-H}\} = 7.85\text{ Hz.}$ ), 7.53 (m, 1H, 24-H), 7.88 (t, 1H, 23-H,  $^3J\{23\text{-H}, 22\text{-H}\} = 7.85\text{ Hz.}$ ), 8.56 (d, 1H, 16-H,  $^3J\{16\text{-H}, 15\text{-H}\} = 7.35\text{ Hz}$ ), 8.61 (d, 2H, 18-H), 8.69 (m, 1H, 25-H).

$^{13}\text{C}$ -NMR (125.73 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$ [ppm] = 11.63 (C-1), 12.20 (C-7), 14.51 (C-5), 16.33 (C-4), 57.18 (C-14), 109.01 (C-19), 112.23 (C-15), 124.50 (C-22), 125.23 (C-24), 127.22 (C-11), 128.37 (C-12), 129.78 (C-8), 132.61 (C-3), 134.43 (C-10), 136.39 (C-13), 137.97 (C-6), 138.15 (C-23), 139.67 (C-9), 145.97 (C-16), 149.37 (C-25), 150.43 (C-21), 150.74 (C-20), 153.28 (C-2), 159.40 (C-17).

Massenspektroskopie: hochaufgelöstes Spektrum (ESI, positive ion mode in Methanol, 10  $\mu$ M)

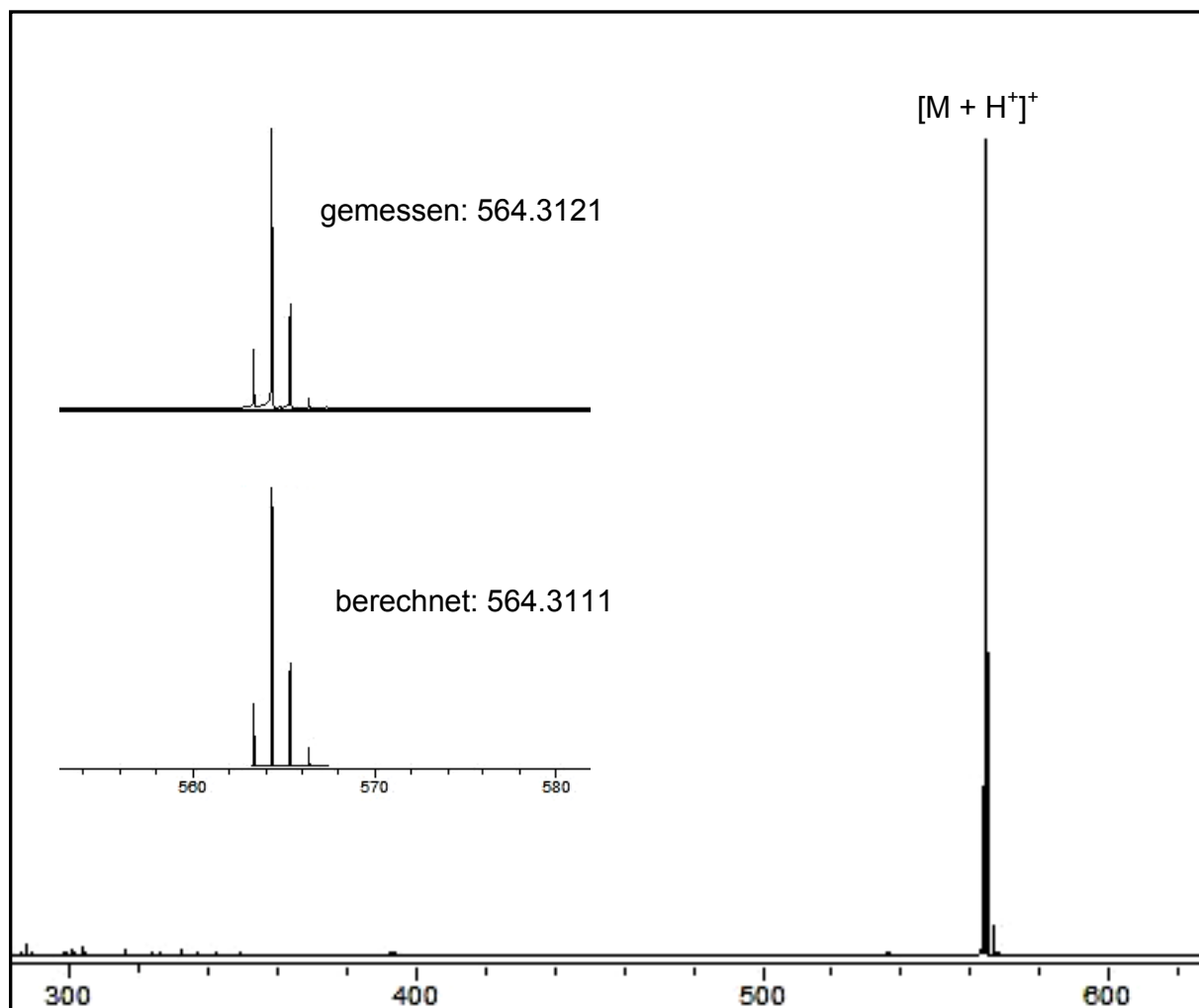
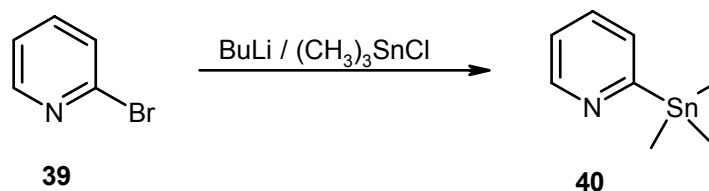


Abbildung 62.: hochaufgelöstes Massenspektrum von **37**

berechnete monoisotopische Masse für $C_{36}H_{36}BF_2N_5H [M + H^+]^+$ :	564.3111
gemessen:	564.3121
Abweichung:	1.0 ppm

### 8.11.3 Synthese BODIPY 3

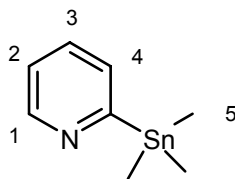
#### 8.11.3.1 Synthese von 2-(Trimethylstannyl)pyridin (**40**)<sup>[113]</sup>



Eine Lösung aus 6.32 g (40.0 mmol, 3.83 mL) Brompyridin (**39**) in 30 mL trockenem THF wurde unter Inertgas auf -78°C temperiert und tropfenweise mit 18.1 mL (45.3 mmol) einer 2.5 M BuLi-Lösung versetzt. Die braune Reaktionsmischung wurde 45 Minuten bei dieser gerührt und anschließend mit 8.77 g (44.0 mmol) Trimethylzinnchlorid versetzt. Nach 45 Minuten wurde die grüne Lösung auf -40°C temperiert und mit 53.0 mL Wasser versetzt. Die wässrige Phase wurde 3 mal mit 30 mL Diethylether extrahiert. Nachdem die hellgelbe organische Phase mit einer gesättigten Natriumchlorid-Lösung gewaschen wurde kann sie über Magnesiumsulfat getrocknet werden. Nach Entfernung des Lösungsmittels erfolgte die Reinigung mittels Destillation (ÖPV 80 °C).

Ausbeute: 5.72 g, 2-(Trimethylstannyl)pyridin (**40**), 59% [Lit<sup>[113]</sup>: 55%]

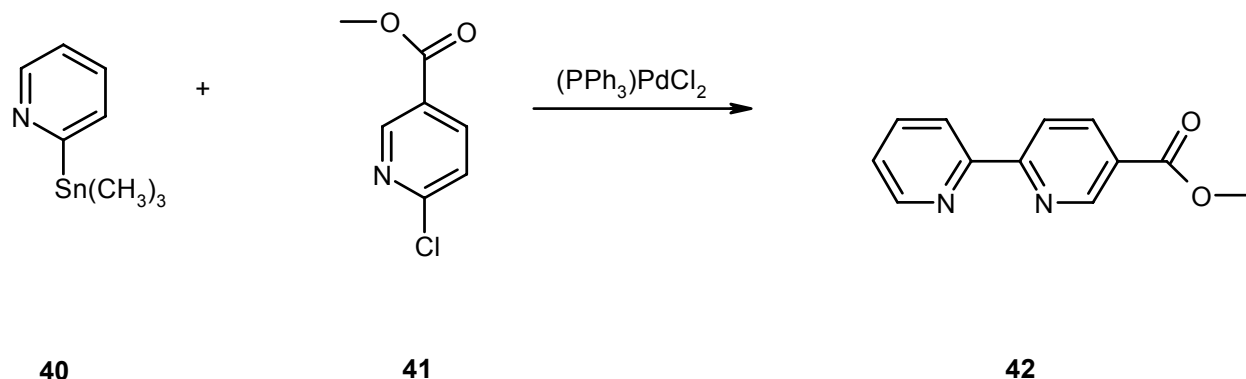
Charakterisierung:



<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ [ppm] = 0.27 (s, 9H, 5-H), 7.22 (m, 1H, 4-H), 7.51-7.61 (m, 2H, 3-H, 2-H), 8.67 (d, 1H, 1-H).



### 8.11.3.2 Synthese von 2,2'-Bipyridin-5-carbonsäuremethylester (**42**)<sup>[114]</sup>

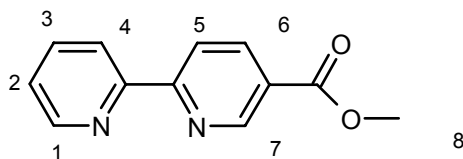


Eine Lösung aus 3.27 g (20.7 mmol) Methyl-6-chlornicotinate (**41**) und 5.72 g (23.7 mmol) 2-Trimethylstannylpyridin (**40**) in 60 mL trockenem Xylol wurde mit 0.75 g (1.08 mmol)  $(\text{PPh}_3)_2\text{PdCl}_2$  versetzt. Die entstandene Suspension wird bei 135°C gerührt. Reaktionskontrolle DC (Alox, Hexan/Ethylacetat, 5/1). Reaktionsdauer 90 min. (Lit. 7h). Nachdem das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt wurde, konnte der Reaktionsrückstand in 10.0 mL Dichlormethan aufgeschlämmt und über Celite filtriert werden. Reinigung : Säule Alox<sub>neutral</sub>. (Hexan / Ethylacetat, 5 / 2).

Aubeute: 3.2 g, 2,2'-Bipyridin-5-carbonsäuremethylester (**42**), 54% [Lit.<sup>[114]</sup>: 84%]

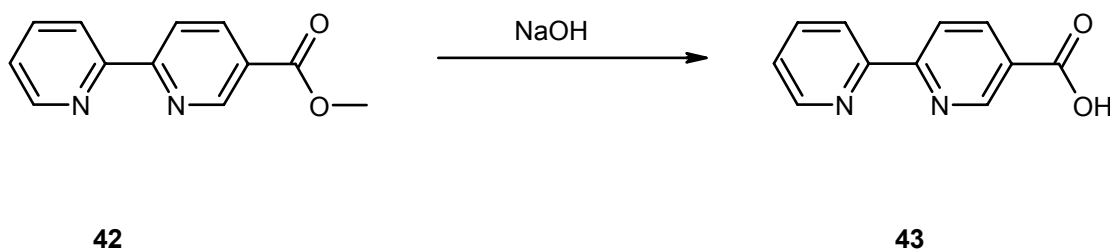
Schmelzpunkt: 106°C [Lit.<sup>[114]</sup>: 108-110°C]

Charakterisierung:



$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta[\text{ppm}] = 3.98$  (s, 3H, 8-H), 7.38 (m, 1H, 3-H), 7.82 (m, 1H, 2-H), 8.41 (m, 1H, 4-H), 8.45 (m, 2H, 5-H, 1-H), 8.65 (m, 1H, 6-H), 9.23 (s, 1H, 7-H).

#### 8.11.3.3 Synthese von 2,2'-Bipyridin-5-carbonsäure (**43**)<sup>[114]</sup>

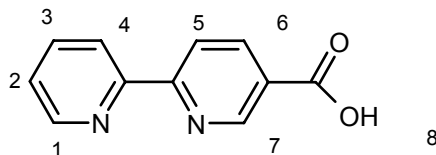


3.20 g (14.8 mmol) des Esters **42** wurden in 15.0 mL heißem Methanol gelöst und mit 15.0 mL 1N NaOH versetzt. Die Reaktionsmischung wurde bei Raumtemperatur gerührt. Die Überprüfung des Umsatzes fand mittels Dünnschichtchromatographie ( $\text{Aluminiumoxid}_{\text{neutral}}$ ) statt. Nachdem das Lösungsmittel entfernt wurde konnte die wässrige Phase mit 0.5 N HCl auf einen pH-Wert von 3.5-4.0 eingestellt werden. Das Produkt **43** kristallisiert unter Kühlung aus. Der Feststoff wurde im Anschluß mit Wasser gewaschen und an der Luft getrocknet.

Ausbeute: 2.06 g, 2,2'-Bipyridin-5-carbonsäure (**43**), 70% [Lit.: 89 %]

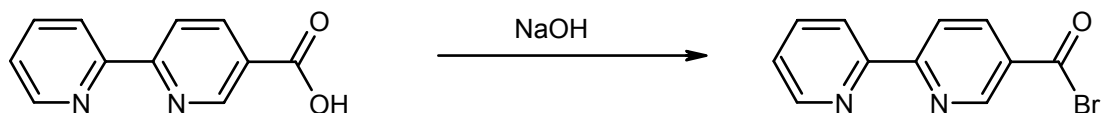
Schmelzpunkt : 199°C [Lit.<sup>[114]</sup>: 196-200°C]

Charakterisierung:



$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta[\text{ppm}] = 5.76$  (s, 1H, 8-H), 7.38 (m, 1H, 3-H), 7.82 (m, 1H, 2-H), 8.41 (m, 1H, 4-H), 8.45 (m, 2H, 5-H, 4-H), 8.65 (m, 1H, 6-H), 9.23 (s, 1H, 7-H).

#### 8.11.3.4 Syntheseversuche von 2,2'-Bipyridin-5-carbonsäurehalogeniden

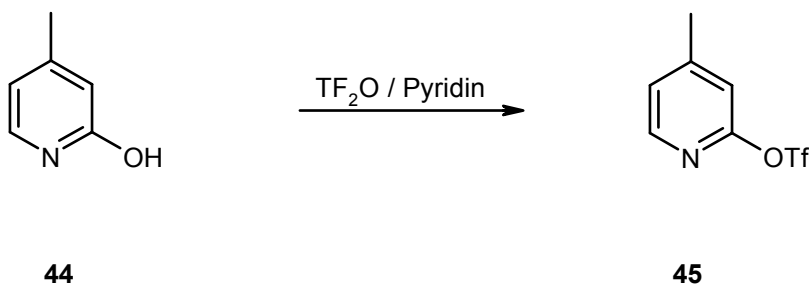


**43**

1.65 g (8.20 mmol) der Säure **43** wurden mit 7.7 mL (82.0 mmol) Phosphortribromid versetzt und 3 Stunden bei 135 °C gerührt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wird überschüssiges Phosphortribromid im Ölpumpenvakuum bei 80 °C abkondensiert. Der zurückbleibende gelbe Feststoff wurde mit 10 mL absolutem Toluol gewaschen, das Lösungsmittel wird erneut im Ölpumpenvakuum entfernt. Dieser Vorgang wird drei mal wiederholt. Der erhaltene hellgelbe Feststoff zeigt den gleichen Schmelzpunkt wie das Edukt.

Chlorierungsprodukt mit Thionylchlorid zeigte ebenfalls den gleichen Schmelzpunkt.

### 8.11.3.5 Synthese 2-Trifluormethansulfonsäure-4-methylpyridin (**45**)<sup>[124]</sup>

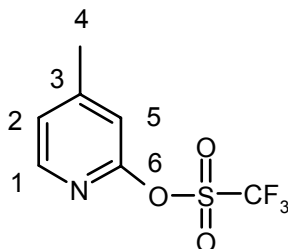


1.00 g (9.20 mmol) 2-Hydroxy-4-methylpyridin (**44**) wurden in 40.0 mL trockenem Pyridin gelöst. Die Lösung wurde auf 0°C abgekühlt, mit 3.18 g (11.3 mmol, 1.88 mL),  $\text{TF}_2\text{O}$  versetzt (Spritze) und 30 Minuten bei dieser Temperatur gerührt. Nach Erwärmung auf Raumtemperatur wurde die Reaktionsmischung auf 50.0 mL Wasser gegossen und drei mal mit je 20.0 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet.

Nachdem das Lösungsmittel bis auf 5 mL entfernt wurde, erfolgt die Reinigung über Säulenchromatographie (Florisil, Hexan / Ethylacetat, 8 / 2). Man erhielt ein farbloses Öl.

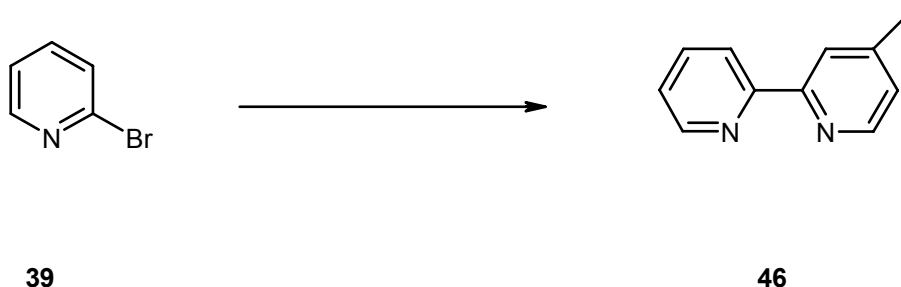
Ausbeute: 2.19 g, 2-Trifluormethansulfonsäure-4-methylpyridin (**45**), 94 %  
[Lit<sup>[124]</sup>: 90%]

Charakterisierung:



$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$ [ppm] = 2.46 (s, 4 H, 6-H), 7.00 (s, 1H, 4-H), 7.19 (d, 1H, 2-H,  $^3\text{J}\{1\text{-H}, 2\text{-H}\} = 5.1$  Hz), 8.25 (d, 1H, 1-H,  $^3\text{J}\{2\text{-H}, 1\text{-H}\} = 5.1$  Hz).

### 8.11.3.6 Synthese 4-Methyl-2,2'-bipyridin (**46**)<sup>[124]</sup>

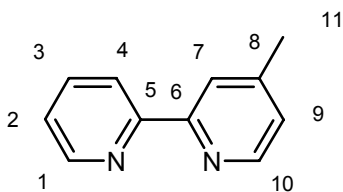


20.0 mL absolutes THF wurden mittels eines Aceton-Trockeneisbades auf  $-78^{\circ}\text{C}$  gekühlt. Nach Zugabe von 5.20 mL (13 mmol) BuLi-Lösung (2.5 M in Hexan) wurden 1.05 g (6.64 mmol) 2-Brompyridin (**39**) langsam zugetropft (Spritze) und die Lösung 30 Minuten bei  $-78^{\circ}\text{C}$  gerührt. Danach erfolgt die Zugabe von 2.00 g (14.6 mmol) fein gemörsertem  $\text{ZnCl}_2$ . Die Reaktionsmischung wurde 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nacheinander wurden zunächst 1.31 g (5.43 mmol) Triflat **45**, dann 0.50 g (12.0 mmol) LiCl und 59.0 mg (0.38 mmol)  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  zugegeben. Die Reaktionslösung wurde 15 Stunden unter Rückfluß gehalten. Nach Abkühlung konnte sie zu einer Lösung aus 18.0 g Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) in 150 mL Wasser gegeben werden. Der pH-Wert der Mischung wurde mittels einer gesättigten Natriumhydrogencarbonat-Lösung auf pH 8 eingestellt. Die wässrige Phase wurde drei mal mit je 70.0 mL Dichlormethan extrahiert und die vereinigten organischen Phasen im Anschluß über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch mittels einer Säule ( $L = 15\text{ cm}$ ,  $d = 3.5\text{ cm}$ ) gefüllt mit desaktiviertem (s.u.) Kieselgel (40 g) gereinigt. Als Laufmittel diente ein Gemisch aus Hexan/Ethylacetat (7/3).: Das Kieselgel wurde zuvor mit Hexan + 10% Triethylamin aufgeschlämmt und 15 min. stehen gelassen. Nach Füllung der Säule wurde mit Hexan gewaschen bis sich ein neutraler pH-Wert eingestellt hat. Es wurde ein beiger Feststoff erhalten.

Ausbeute: 0.78 g, 4-Methyl-2,2'-bipyridin (**46**), 84 %, [Lit.<sup>[124]</sup>: 70%]

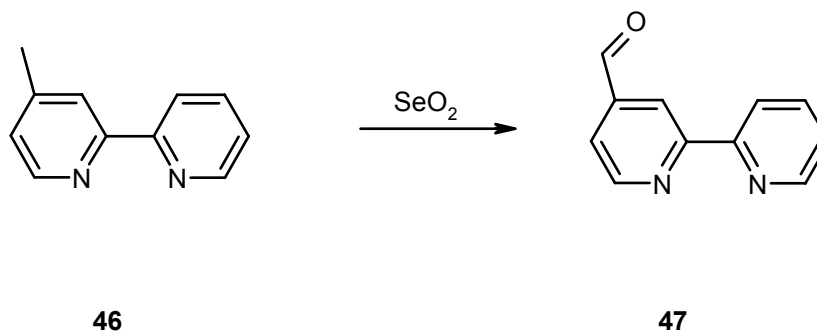
Schmelzpunkt: 63°C [Lit<sup>[124]</sup>.: 62-64°C]

Charakterisierung:



<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ[ppm] = 2.43 (s, 3H, 11-H), 7.13 (d, 1H, 9-H, <sup>3</sup>J{9-H, 10-H} = 4.95 Hz), 7.30 (m, 1H, 2-H, <sup>3</sup>J{2-H, 1-H} = 4.80 Hz, <sup>3</sup>J{2-H, 3-H} = 7.12 Hz), 7.80 (dd, 1H, 3-H, <sup>3</sup>J{3-H, 2-H} = 7.12 Hz, <sup>3</sup>J{3-H, 4-H} = 8.00 Hz), 8.22 (s, 1H, 7-H), 8.38 (d, 1H, 4-H, <sup>3</sup>J{4-H, 3-H} = 8.00 Hz), 8.53 (d, 1H, 10-H, <sup>3</sup>J{10-H, 9-H} = 4.95 Hz), 8.67 (d, 1H, 1-H, <sup>3</sup>J{1-H, 2-H} = 4.80 Hz).

#### 8.11.3.7 Synthese 2,2'-Bipyridin-4-carbaldehyd (**47**)<sup>[116]</sup>



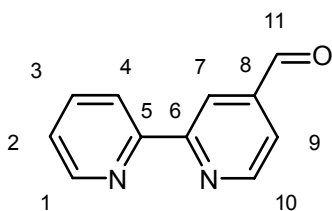
Eine Mischung aus 0.65 g (3.80 mmol) Methyl-bipyridyl (**46**) und 0.63 g (5.70 mmol) SeO<sub>2</sub> wurden in 25 mL Dioxan aufgenommen und mit 0.1 mL Wasser versetzt. Nachdem die Reaktionsmischung zwei Stunden unter Rückfluß gehalten wurde, setzt man erneut 0.63 g SeO<sub>2</sub> und 0.1 mL Wasser zu. Die Lösung wurde über Nacht auf Rückfluß erwärmt. Die noch warme Reaktionslösung wurde dann mit Kieselgel versetzt bis eine homogene Mischung entstand.

Die Reinigung erfolgte mittels Säulenchromatographie über Florisil (40 g), mit einem Laufmittelgemisch aus Hexan / Ethylacetat, 6 / 2).

Ausbeute: 0.27 g (1.48 mmol), 2,2'-Bipyridyl-4-carbaldehyd (**47**), 39%, [Lit.<sup>[116]</sup>;24%].

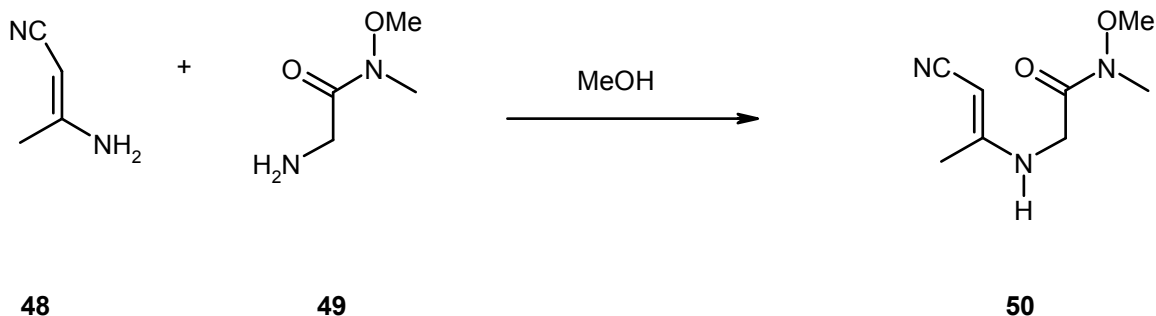
Schmelzpunkt: 84°C, [Lit.: 84.8-86°C]

Charakterisierung :



<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ[ppm] = 7.37 (m, 1H, 2-H, <sup>3</sup>J{2-H, 1-H} = 4.80 Hz, <sup>3</sup>J{2-H, 3-H} = 7.80 Hz), 7.73 (d, 1H, 9-H, <sup>3</sup>J{9-H, 10-H} = 4.90 Hz), 7.86 (m, 1H, 3-H, <sup>3</sup>J{3-H, 4-H} = 7.80 Hz, <sup>3</sup>J{3-H, 2-H} = 7.80 Hz), 8.45 (m, 1H, 4-H, <sup>3</sup>J{4-H, 3-H} = 7.80 Hz), 8.72 (m, 1H, 1-H, <sup>3</sup>J{1-H, 2-H} = 4.80 Hz), 8.84 (s, 1H, 7-H), 8.90 (d, 1H, 10-H, <sup>3</sup>J{10-H, 9-H} = 4.90 Hz), 10.19 (s, 1H, 11-H)..

### 8.11.3.8 Synthese von 3 ((E)-2-Cyano-1-methyl-vinylamino)-N-methoxy-N-methyl-acetamid (**50**)[117]



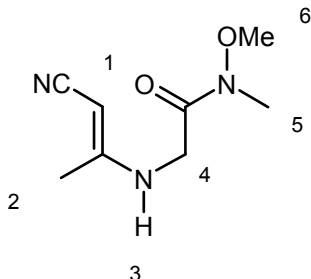
1.05 g (12.8 mmol) 3-Aminocrotonsäurenitril (**48**) und 1.72 g (14.62 mmol) 2-Amino-N-methoxy-N-methoxypropionsäureamid (**49**) wurden in 25.0 mL Methanol bei 30°C 6 Stunden gerührt. Der Umsatz wurde mit Dünnschichtchromatographie ( Kieselgel, Dichlormethan / Diethylether, 10/1) überprüft. Nach Beendigung der Reaktion wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der entstandene Feststoff wurde mehrmals mit Wasser gewaschen und anschließend getrocknet.

Zur Reinigung wurde das Rohprodukt in einem Gemisch aus Dichlormethan/ Diethylether ( 50 /1) umkristallisiert. Man erhielt farblose Nadeln.

Ausbeute: 1.85 g (9.60 mmol), 3-((E)-2-Cyano-1-methyl-vinylamino)-N-methoxy-N-methyl-acetamid (**50**), 75% [Lit.: 79%<sup>[117]</sup>]

Schmelzpunkt: 97°C [Lit.<sup>[117]</sup>: 98°C]

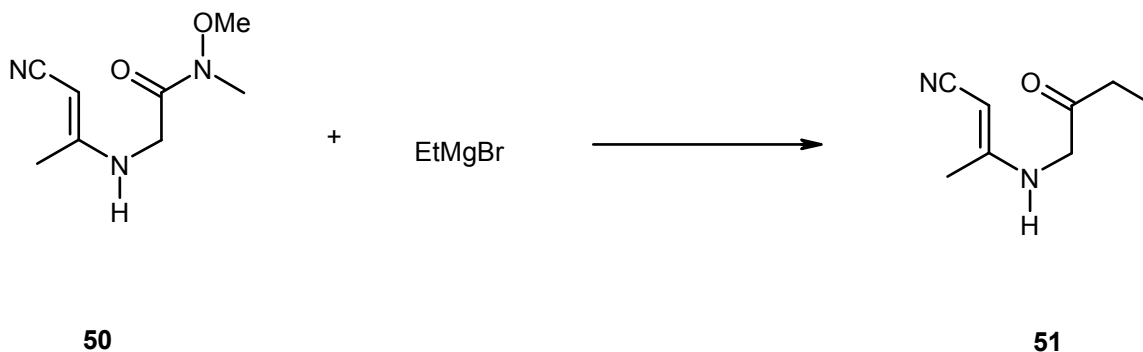
Charakterisierung:





$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 2.19 (s, 3H, 2-H), 3.28 (s, 3H, 5-H), 3.76 (s, 3H, 6-H), 3.79 (s, 1H, 1-H), 3.84 (s, 2H, 4-H), 5.35 (s, 1H, 3-H).

#### 8.11.3.9 Synthese von Ethyl-((N-methoxycarbonyl)-methylamino)-crotonat (**51**)<sup>[117]</sup>

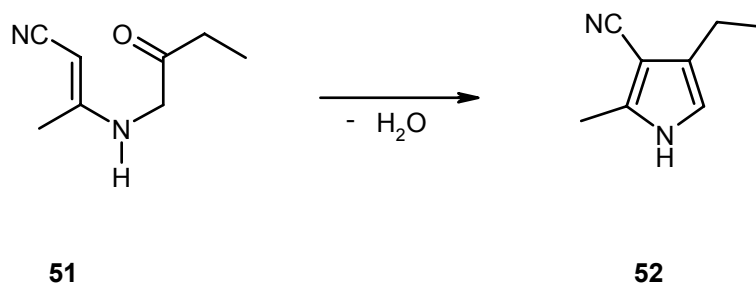


Zu einer Lösung aus 1.85 g (9.60 mmol) 3-((E)-2-Cyano-1-methyl-vinylamino)-N-methoxy-N-methyl-acetamid (**50**) in 100 mL absolutem THF wurde über einen Zeitraum von 15 Minuten 3.80 g (28.5 mmol) Ethylmagnesiumbromid zugetropft. Der Umsatz wurde mittels Dünnschichtchromatographie (Kieselgel, Dichlormethan / Diethylether, 10/1) verfolgt.

Nach vollständiger Umsetzung wird die Reaktionslösung mit 30 mL Wasser versetzt, anschließend wird die organische Phase abdekantiert und mit 50 mL Wasser extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden zunächst mit Natriumsulfat getrocknet und anschließend von Lösungsmittel befreit.

Es erfolgte keine weitere Reinigung.

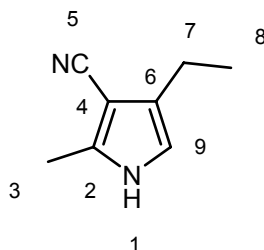
### 8.11.3.10 Synthese von 4-Ethyl-2-methylpyrrol-3-carbonitril (**53**)<sup>[117]</sup>



Eine Lösung aus 1.40 g (9.60 mmol) Ethyl-((N-methoxycarbonyl)-methylamino)-crotonat (**52**) und 0.66 g (9.60 mmol) frisch dargestelltem Natriumethanolat in 15 mL Ethanol wurde eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluß wurde die Reaktionslösung zunächst mit 100.0 mL Wasser versetzt und dann drei mal mit je 80.0 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nachdem das Lösungsmittel entfernt worden war, erfolgte die Reinigung über Säulenchromatographie. (Kieselgel 120 g, Dichlormethan/Diethylether 20/1). Man erhielt ein farbloses Öl.

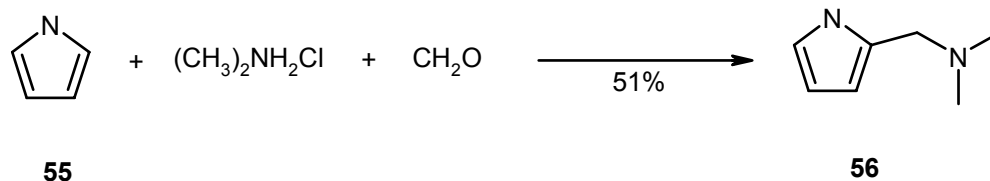
Ausbeute: 0.77 g ( 5.76 mmol), 4-Ethyl-2-methylpyrrol-3-carbonitril (**52**), 60%  
[Lit.<sup>[117]</sup>: 68%]

Charakterisierung:



<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ[ppm] = 1.22 (t, 3H, 8-H), 2.36 (s, 3H, 3-H), 2.55 (m, 3H, 7-H), 6.38 (s, 1H, 9-H), 8.78 (s, 1H, 1-H).

### 8.11.3.11 Synthese von 2-(Dimethylaminomethyl)methylpyrrol (**55**)<sup>[125]</sup>

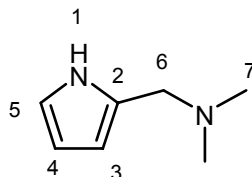


Eine Lösung von 6.40 g (78.2 mmol) Dimethylamoniumchlorid in 6.68 g (78.2 mmol) Formalinlösung wurde langsam zu 5.00 g (74.5 mmol) Pyrrol getropft. Die Temperatur sollte 60 °C nicht überschreiten. Die Reaktionsmischung wurde zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend auf eine 25%ige wäßrige Natriumhydroxidlösung gegossen. Die wässrige Phase wurde drei mal mit je 10 mL Diethylether extrahiert. Nach Trocknung der vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat wurde das Lösungsmittel entfernt. Zur vollständigen Reinigung wurde das Produkt mittels fraktionierter Destillation gewonnen. Das Produkt fällt während der Destillation als farbloser Feststoff an..

Ausbeute: 4.76 g (38.1 mmol), 2-(Dimethylaminomethyl)methylpyrrol (**55**), 51%, [Lit<sup>[125]</sup>: 77%]

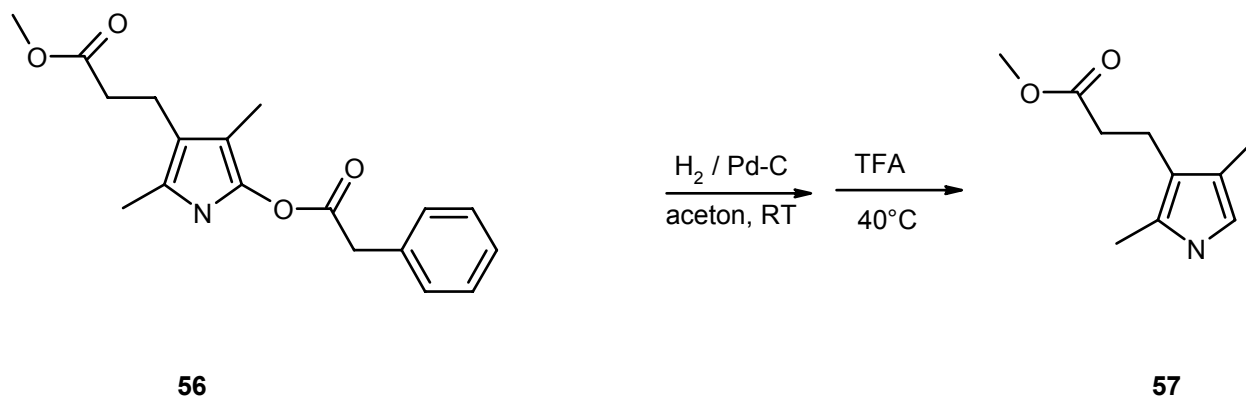
Schmelzpunkt: 62°C [Lit<sup>[125]</sup>: 64°C]

Charakterisierung:



<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ[ppm] = 2.23 (s, 6H, 7-H), 3.43 (s, 2H, 6-H), 6.05 (m, 1H, 4-H), 6.11 (d, 1H, 3-H), 6.72 (d, 1H, 5-H), 8.95 (s, 1H, 1-H).

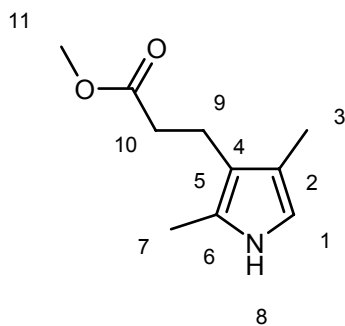
### 8.11.3.12 Synthese 3-(2-Methoxycarbonylethyl)-2,4-dimethylpyrrol (**57**)<sup>[96]</sup>



3.1 g (9.80 mmol) **56** werden in 100 mL Aceton gelöst. Nach der Zugabe von 50.0 mg 10% Pd-C wird die Reaktionsmischung über Nacht unter Wasserstoffatmosphäre gerührt. Der Katalysator wird abfiltriert und mit Aceton gewaschen. Nachdem das Lösungsmittel entfernt wurde wird das Gemisch in 10 mL Trifluoressigsäure aufgenommen und bei 40 °C unter Schutzgas gerührt. Die Reaktionsmischung wurde in Chloroform aufgenommen, anschließend wird die organische Phase mit Wasser gewaschen. Die wäßrige Phase wird erneut mit Chloroform extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Wasser, Natriumcarbonat-Lsg. und Wasser gewaschen, anschließend mit Magnesiumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Das Rohprodukt wird über Kieselgel (Dichlormethan) gereinigt. Man erhält ein gelbes Öl.

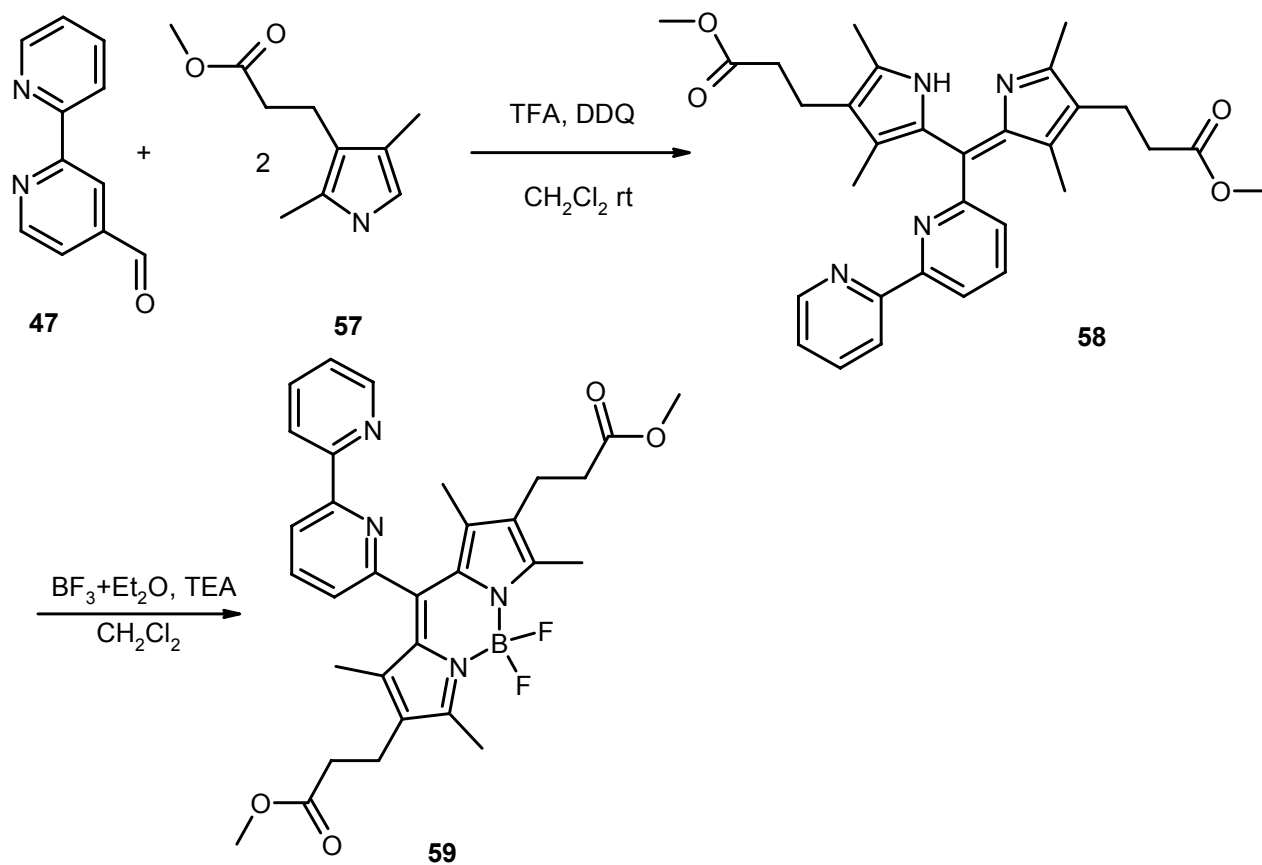
Ausbeute: 1.60g , 3-(2-Methoxycarbonylethyl)-2,4-dimethylpyrrol (**57**), 90%, [Lit<sup>[96]</sup>.: 90%]

Charakterisierung:



$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 2.05 (s, 3H, 10-H), 2.19 (s, 3H, 7-H), 2.49 (m, 2H, 9-H), 2.72 (m, 2H, 10-H), 3.69 (s, 3H, 11-H), 6.39 (s, 1H, 1-H), 7.54 (s, 1H, 8-H).

### 8.11.3.13 Synthese von 2,6-bis-(propionsäuremethylester)-8-(2,2'-bipyridyl)-4,4'-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bor-3a,4a-diaza-s-indacen (BPE) (59)



4.42 (0.24 mmol) 2,2'-Bipyridylaldehyd (**47**) und 8.77 g (0.48 mmol) 3-(2-Methoxycarbonyl)-2,4-dimethylpyrrol (**57**) wurden in 300 mL Dichlormethan gelöst und mit 0.50 mL Trifluoressigsäure versetzt. Die Reaktionslösung wurde 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Zur dunkelroten Reaktionslösung wurde eine Suspension von 5.70 g (24.0 mmol) DDQ in 50.0 mL Dichlormethan innerhalb von 15 min. getropft. Nach 20 Minuten wurde die dunkelviolet gefärbte Reaktionsmischung mit 500 mL Wasser gewaschen und anschließend über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Entfernung des Lösungsmittels wurde der Feststoff **58** erneut in 250 mL Dichlormethan aufgenommen und dann mit 18.0 mL (129 mmol) Triethylamin versetzt. Die Reaktionslösung wurde 20 Minuten bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit 23.0 mL Bortrifluoriddiethyletherat-Lösung versetzt. Nach weiteren 40 Minuten Rühren bei Raumtemperatur wurde die Reaktionslösung nacheinander mit 200 mL Wasser und 50.0 mL 2M NaOH gewaschen. Die wäßrige Phase wurde mit 200 mL Dichlormethan extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet. Nach Entfernung des Lösungsmittels im Ölpumpenvakuum wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt. Säule (L.: 17cm, d.: 7cm) gefüllt mit 250 g Florisil. Als Laufmittel diente ein Gemisch aus Dichlormethan, Hexan, Ethanol in einem Verhältnis von 10/4/1. Das erhaltene Produkt mußte zur vollständigen Reinigung einer zweiten Säulenchromatographie unterzogen werden, dessen Bedingungen bis auf die Menge an eingesetztem Florisil (100 g) die gleichen waren.

Ausbeute: 0.021 g (0.036 mmol), 2,6-bis-(propionsäuremethylester)-8-(2,2'-bipyridyl)-4,4'-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bor-3a,4a-diaza-s-indacen (**59**), 15%

Charakterisierung:

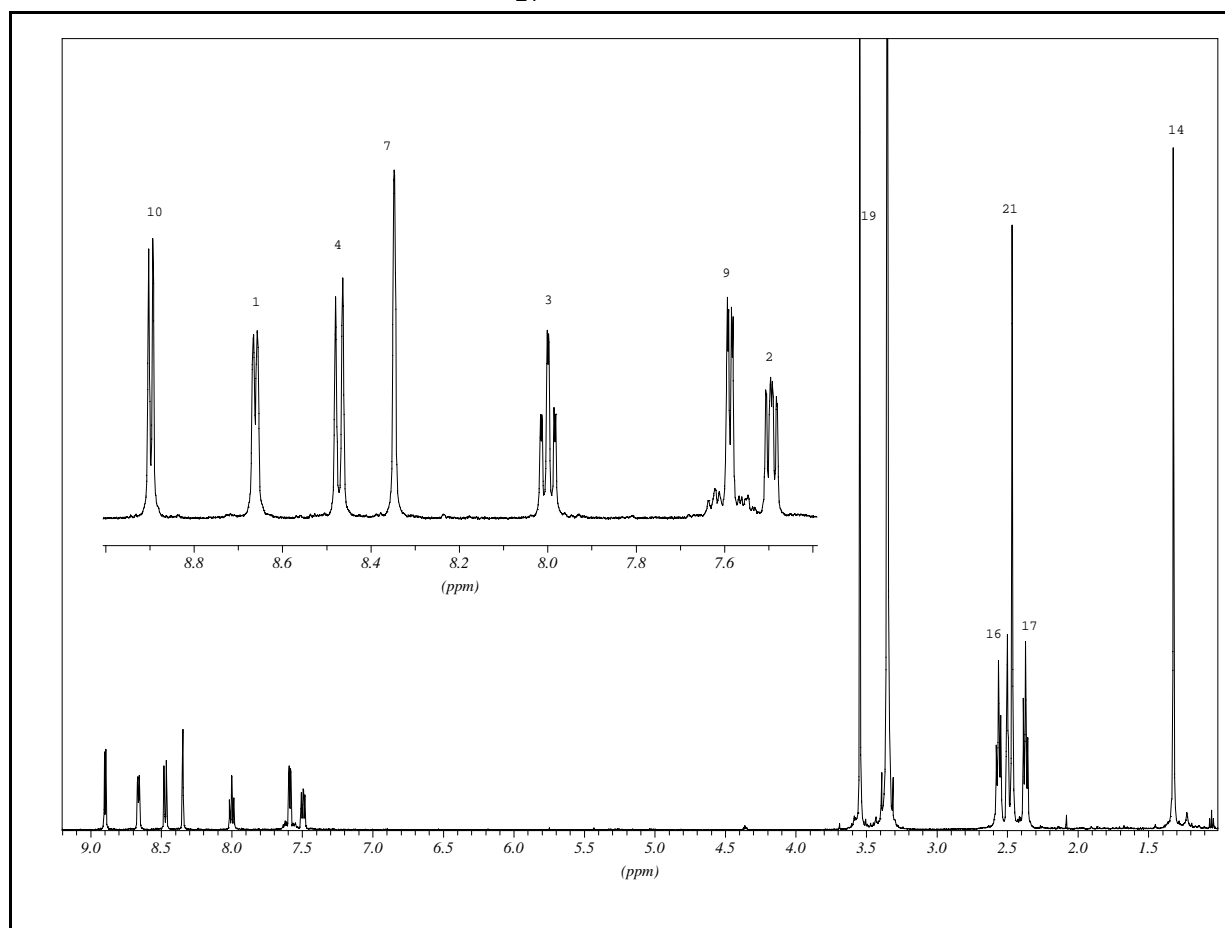
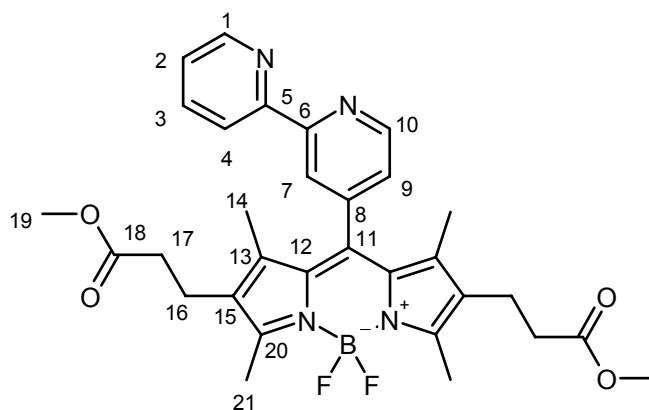


Abbildung 63.:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von **59** in  $\text{DMSO-d}_6$  bei 500 MHz.

$^1\text{H}$ -NMR (500 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ ):  $\delta[\text{ppm}] = 1.33$  (s, 6H, 14-H), 2.37 (t, 4H, 17-H), 2.48 (s, 6H, 21-H), 2.57 (t, 4H, 16-H), 3.55 (s, 6H, 19-H), 7.49 (m, 1H, 2-H), 7.58 (d, 1H, 9-H),  $^3\text{J}\{9\text{-H}, 10\text{-H}\} = 4.9$  Hz), 7.99 (t, 1H, 3-H,  $^3\text{J}\{3\text{-H}, 4\text{-H}\} = 7.7$  Hz), 8.35 (s, 1H, 7-H), 8.47 (d, 1H, 4-H,  $^3\text{J}\{4\text{-H}, 3\text{-H}\} = 7.7$  Hz), 8.65 (d, 1H, 1-H,  $^3\text{J}\{1\text{-H}, 2\text{-H}\} = 3.8$  Hz), 8.89 (d, 1H, 10-H,  $^3\text{J}\{10\text{-H}, 9\text{-H}\} = 4.9$  Hz).

$^{13}\text{C}$ -NMR (125.73 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ ):  $\delta[\text{ppm}] = 11.6$  (C-14), 12.4 (C-21), 18.6 (C-17), 33.3 (C-16), 51.3 (C-19), 119.8 (C-7), 120.7 (C-4), 123.7 (C-9), 124.7 (C-2), 129.0 (C-12), 129.9 (C-13), 137.3 (C-11), 137.5 (C-3), 138.7 (C-20), 143.9 (C-8), 149.5 (C-1), 150.5 (C-10), 154.4 (C-5), 154.7 (C-15), 156.3 (C-6), 172.5 (C-18).



Massenspektroskopie: hochaufgelöstes Spektrum (ESI, positive ion mode in Methanol, 10  $\mu$ M)

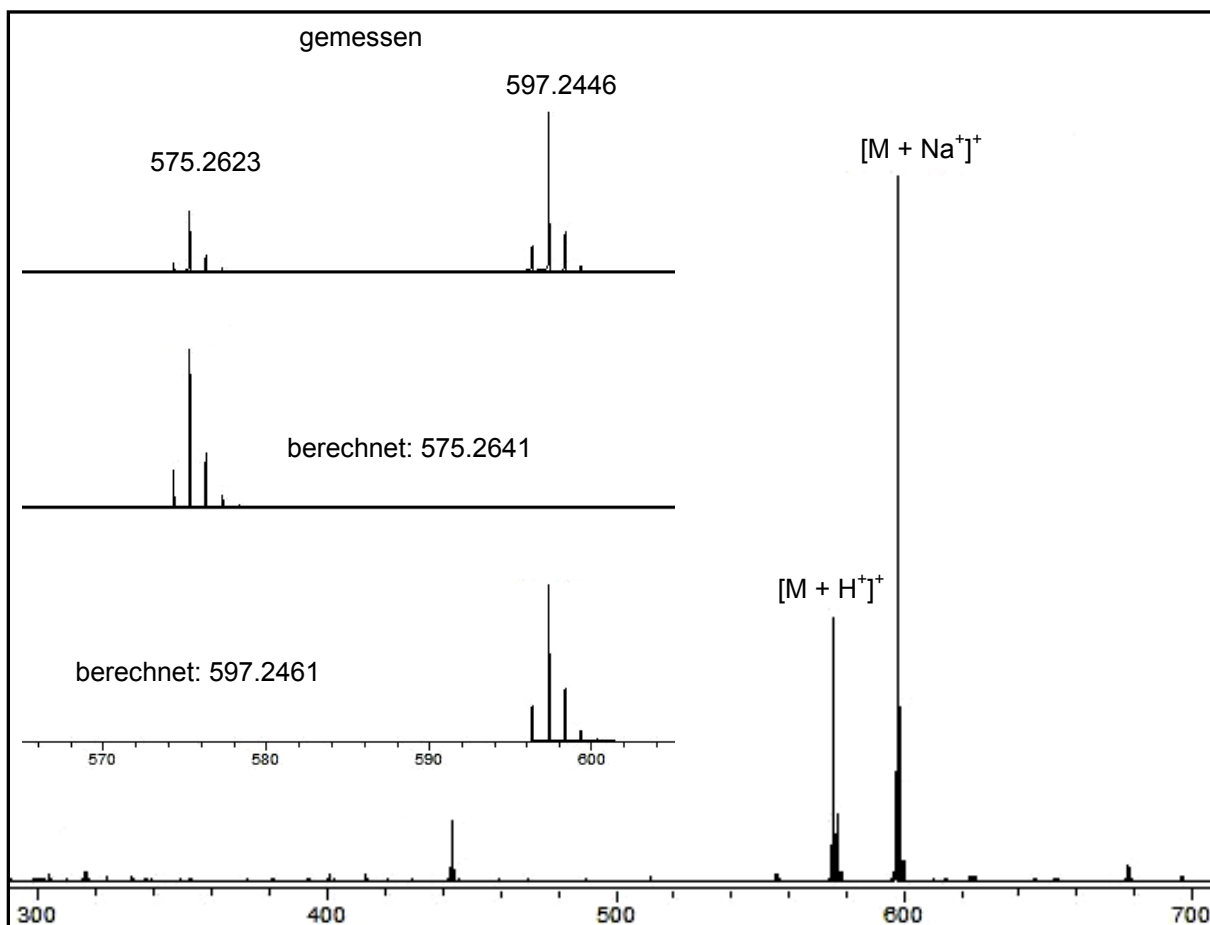
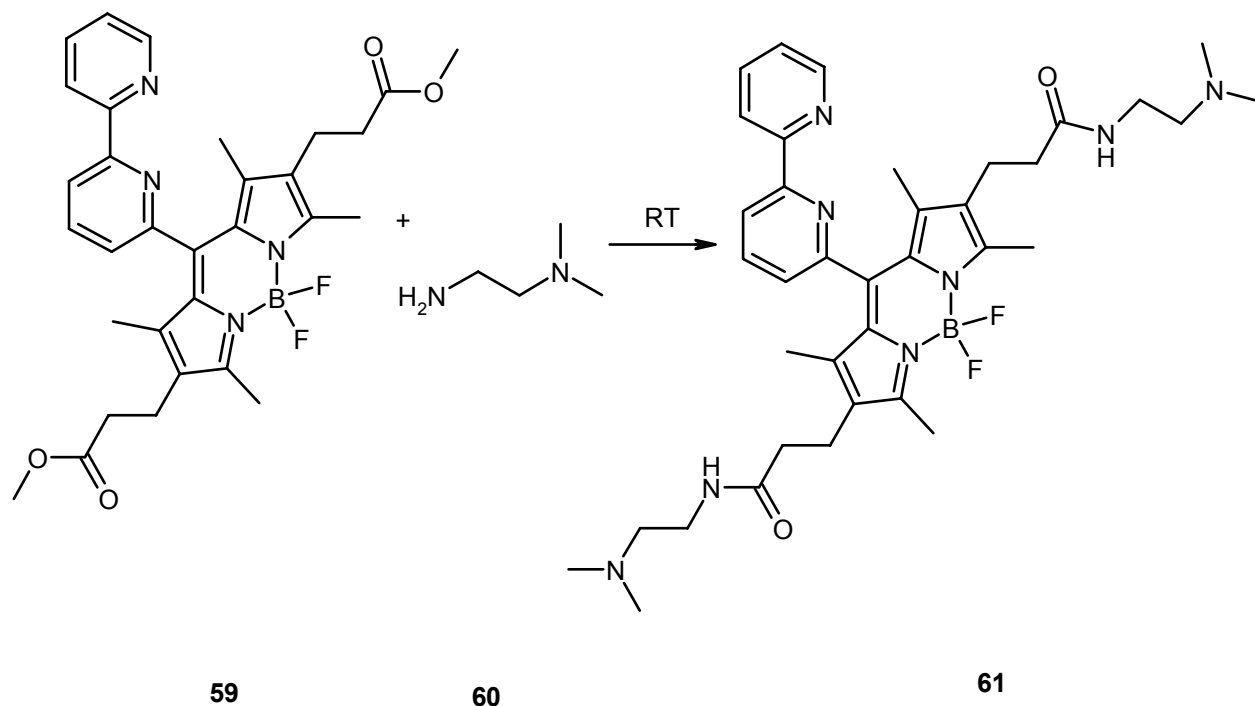


Abbildung 64.: hochaufgelöstes Massenspektrum von **59**

berechnete monoisotopische Masse für $C_{31}H_{34}BF_2N_4O_4$ [ $M + H^+$ ] <sup>+</sup> :	575.2641
gemessen:	575.2623
Abweichung:	1.8 ppm
berechnete monoisotopische Masse für $C_{31}H_{33}BF_2N_4O_4Na$ [ $M + Na^+$ ] <sup>+</sup> :	597.2446
gemessen:	597.2461
Abweichung:	1.5 ppm

**8.11.3.14 Synthese von 2,6-bis-[N-(2-dimethyl-ethyl)-propionamid]-8-(2,2'-bipyridyl)-4,4'-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bor-3a,4a-diaza-s-indacen (BDA) (61)**



2.00 g (3.50 mmol) BPE (**59**) wurden in 70.0 mL Methanol gelöst. Nach Zugabe von 8.00 mL (72.0 mmol) N,N-Dimethylethylendiamin wurde die Reaktionslösung 24 Stunden bei 65°C gehalten. Dann wurden erneut 4.0 mL (36.0 mmol) N,N-Dimethylethylendiamin zugegeben und die Reaktionslösung weitere 48 Stunden auf 65°C erhitzt. Insgesamt lag das N,N-Dimethylethylendiamin im 30-fachen Überschuss vor. Die anschließende dünnschichtchromatographische Untersuchung ergab, dass zu dem Zeitpunkt kein Edukt **59** mehr vorhanden war. Die Reaktionlösung wurde daraufhin bis auf ca. 3 mL eingeeengt und zweimal einer säulenchromatographischen Reinigung unterworfen. Reinigung 1 (150 g Aluminiumoxid<sub>basisch</sub>, Laufmittel: Tetrahydrofuran / Methanol, 5 / 1); Reinigung 2 ( 50 g Aluminiumoxid<sub>basisch</sub>, zunächst nur 150 mL Tetrahydrofuran, danach Tetrahydrofuran / Methanol, 20 / 1). Das verwendete Tetrahydrofuran muss vor Verwendung vom Stabilisator mittels Destillation befreit werden.

Ausbeute: 218 mg (0.32 mmol), 2,6-bis-(X)-8-(2,2'-bipyridyl)-4,4'-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bor-3a,4a-diaza-s-indacen (**61**), 9%.

Charakterisierung:

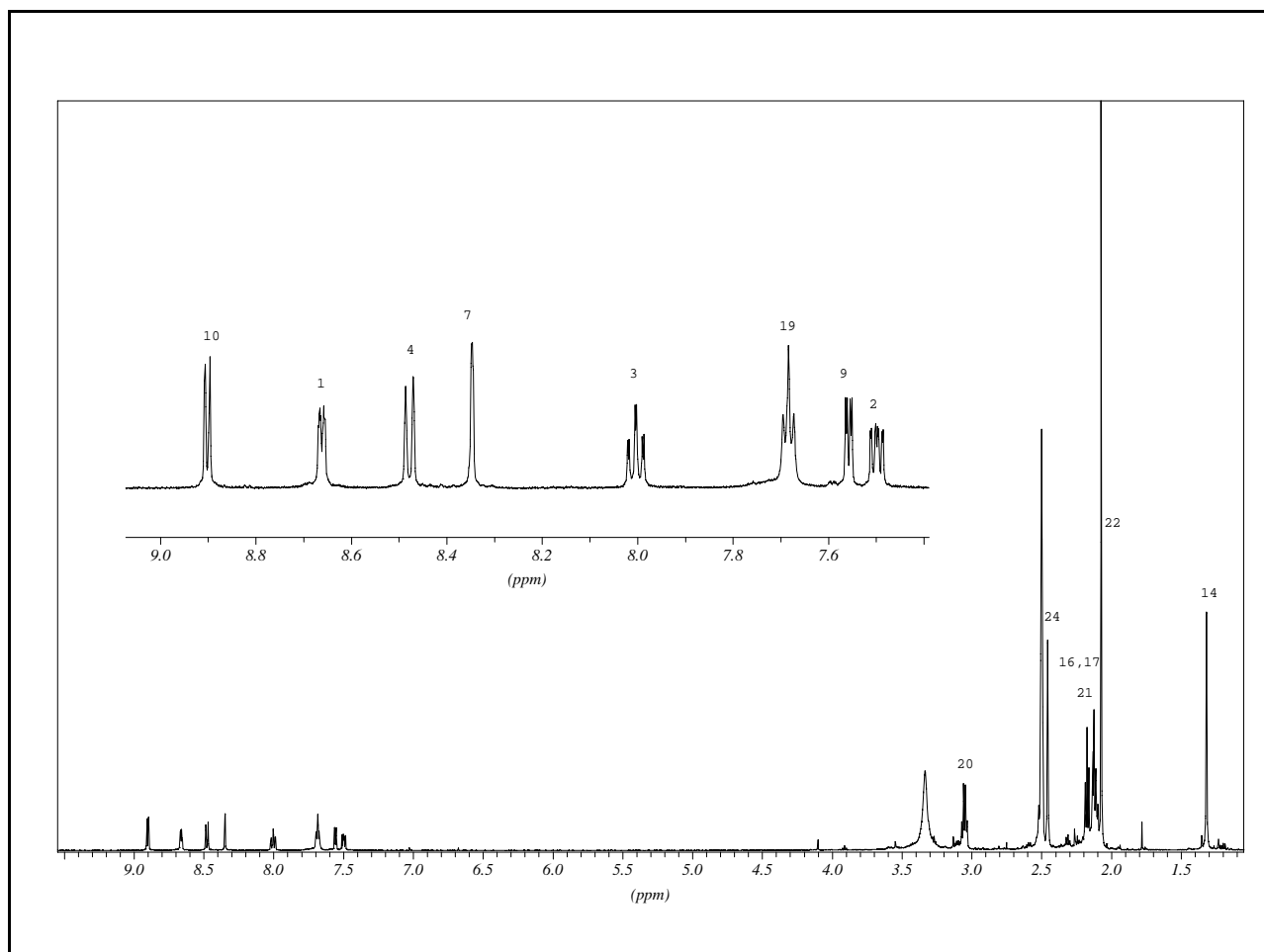
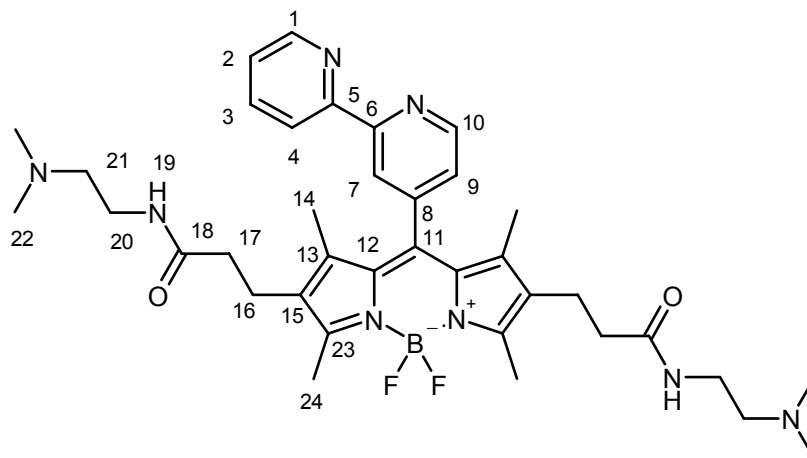


Abbildung 65.:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von **61** in  $\text{DMSO-d}_6$  bei 500 MHz.

$^1\text{H}$ -NMR (500 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ ):  $\delta[\text{ppm}] = 1.33$  (s, 6H, 14-H), 2.37 (t, 4H, 17-H), 2.48 (s, 6H, 21-H), 2.57 (t, 4H, 16-H), 3.55 (s, 6H, 19-H), 7.49 (m, 1H, 2-H), 7.58 (d, 1H, 9-H),  $^3\text{J}\{9\text{-H}, 10\text{-H}\} = 4.9$  Hz), 7.99 (t, 1H, 3-H,  $^3\text{J}\{3\text{-H}, 4\text{-H}\} = 7.7$  Hz), 8.35 (s, 1H, 7-H), 8.47 (d, 1H, 4-H,  $^3\text{J}\{4\text{-H}, 3\text{-H}\} = 7.7$  Hz), 8.65 (d, 1H, 1-H,  $^3\text{J}\{1\text{-H}, 2\text{-H}\} = 3.8$  Hz), 8.89 (d, 1H, 10-H,  $^3\text{J}\{10\text{-H}, 9\text{-H}\} = 4.9$  Hz).

$^{13}\text{C}$ -NMR (125.73 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ ):  $\delta[\text{ppm}] = 11.8$  (C-14), 12.5 (C-24), 19.5 (C-16), 35.3 (C-17), 36.7 (C-20), 45.1 (C-22), 58.2 (C-21), 119.8 (C-7), 120.7 (C-4), 123.7 (C-9), 124.8 (C-2), 128.9 (C-12), 130.7 (C-15), 136.9 (C-8), 137.6 (C-3), 138.4 (C-11), 143.9 (C-6), 149.5 (C-1), 150.4 (C-10), 154.3 (C-5), 154.7 (C-13), 156.3 (C-23), 171.0 (C-18).

Massenspektroskopie:    hochaufgelöstes Spektrum (ESI-TOF, positiv ion mode  
in Methanol, 5µM)

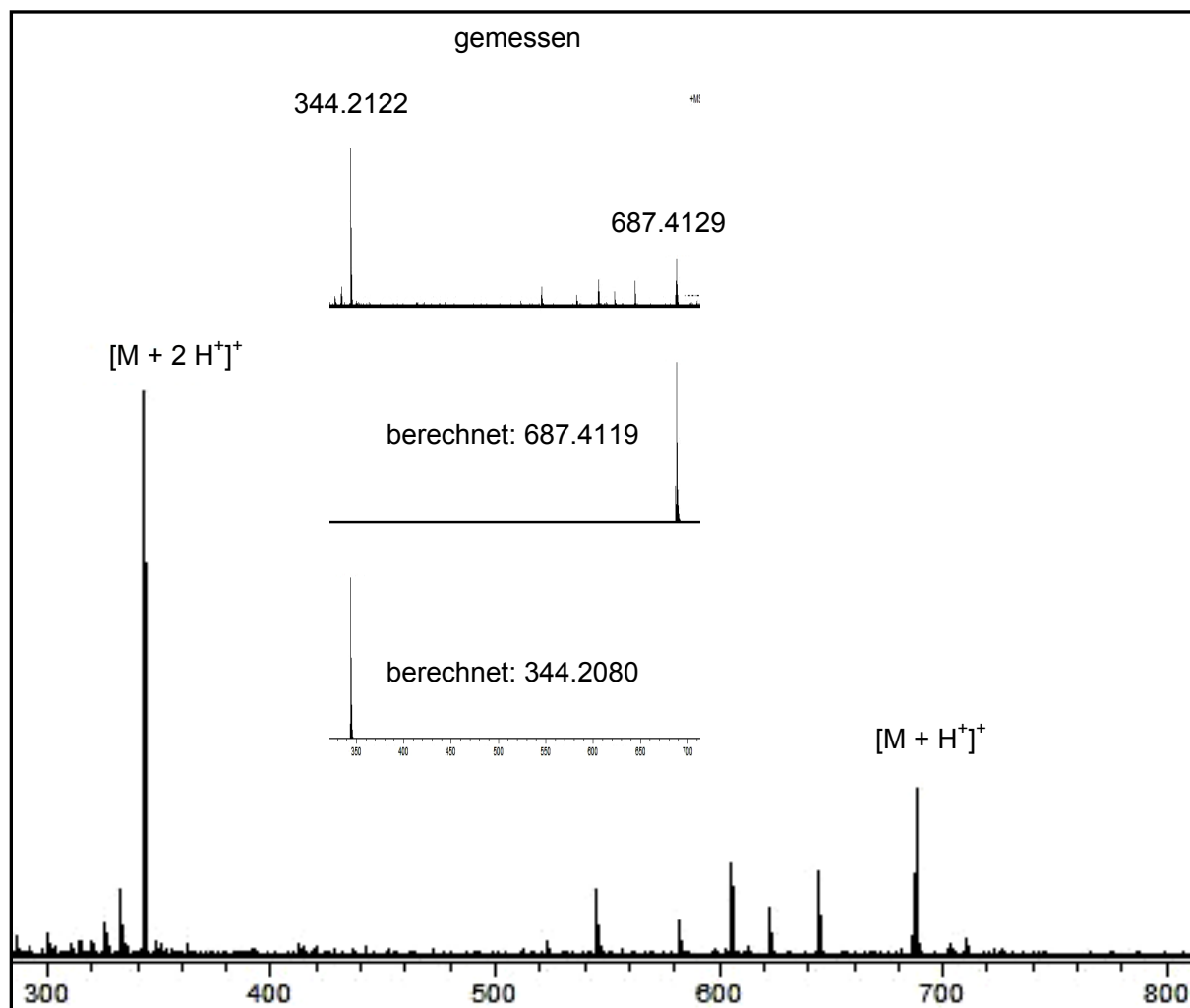


Abbildung 66.: hochaufgelöstes Massenspektrum von **61**

berechnete monoisotopische Masse für  $C_{37}H_{50}BF_2N_8O_2$   $[M + H^+]^+$ : 687.4119

gemessen: 687.4129

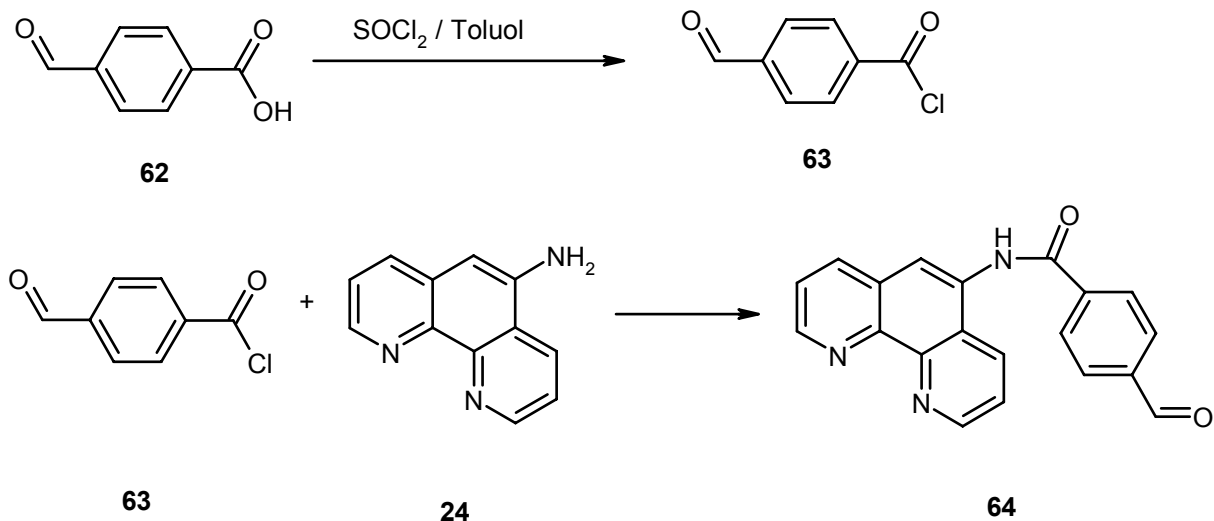
Abweichung: 1 ppm

berechnet monoisotopische Masse für  $C_{37}H_{51}BF_2N_8O_2$   $[M + 2H^+]^+$ : 344.2122

gemessen: 344.2096

Abweichung: 3 ppm

#### 8.11.4 Synthese von 4-Formyl-N-(1,10)-phenanthrolin-5-benzamid (65)



1.00 g (6.70 mmol) 4-Carboxybenzaldehyd wurden in 7.97 g (67.0 mmol) Thionylchlorid gelöst und unter Schutzgasatmosphäre eine Stunde unter Rückfluß erwärmt. Nach Entfernung des überschüssigen Thionylchlorids im Ölpumpenvakuum wurde das Rohprodukt mit 25 mL Toluol versetzt und erneut vom Lösungsmittel befreit. Die Prozedur wurde noch zwei mal wiederholt, bis das zunächst hellgelb gefärbte Rohprodukt nach dem Trocknen einen weißen Feststoff bildet. Es fand keine Charakterisierung des Produktes statt, sondern es wurde vollständig im anschließenden Reaktionsschritt eingesetzt.

Zu einer Lösung aus 0.98 g (5.00 mmol) 5-Amino-1,10-phenanthrolin wurden 1.24 g (6.70 mmol) 4-Formyl-benzoylchlorid gelöst in 50 mL absolutem Acetonitril über einen Zeitraum von 15 Minuten getropft. Aus der zunächst orangefarbenen Lösung fiel innerhalb von 30 Minuten ein hellbeiger Feststoff aus, welcher über eine Glasfritte (G IV) abfiltriert wurde. Das Rohprodukt wurde mehrmals mit insgesamt 30 mL Tetrahydrofuran gewaschen und im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Ausbeute: 0.85 g (2.60 mmol), 4-Formyl-N-(1,10)-phenanthrolin-5-benzamid (64), 52%

Charakterisierung:

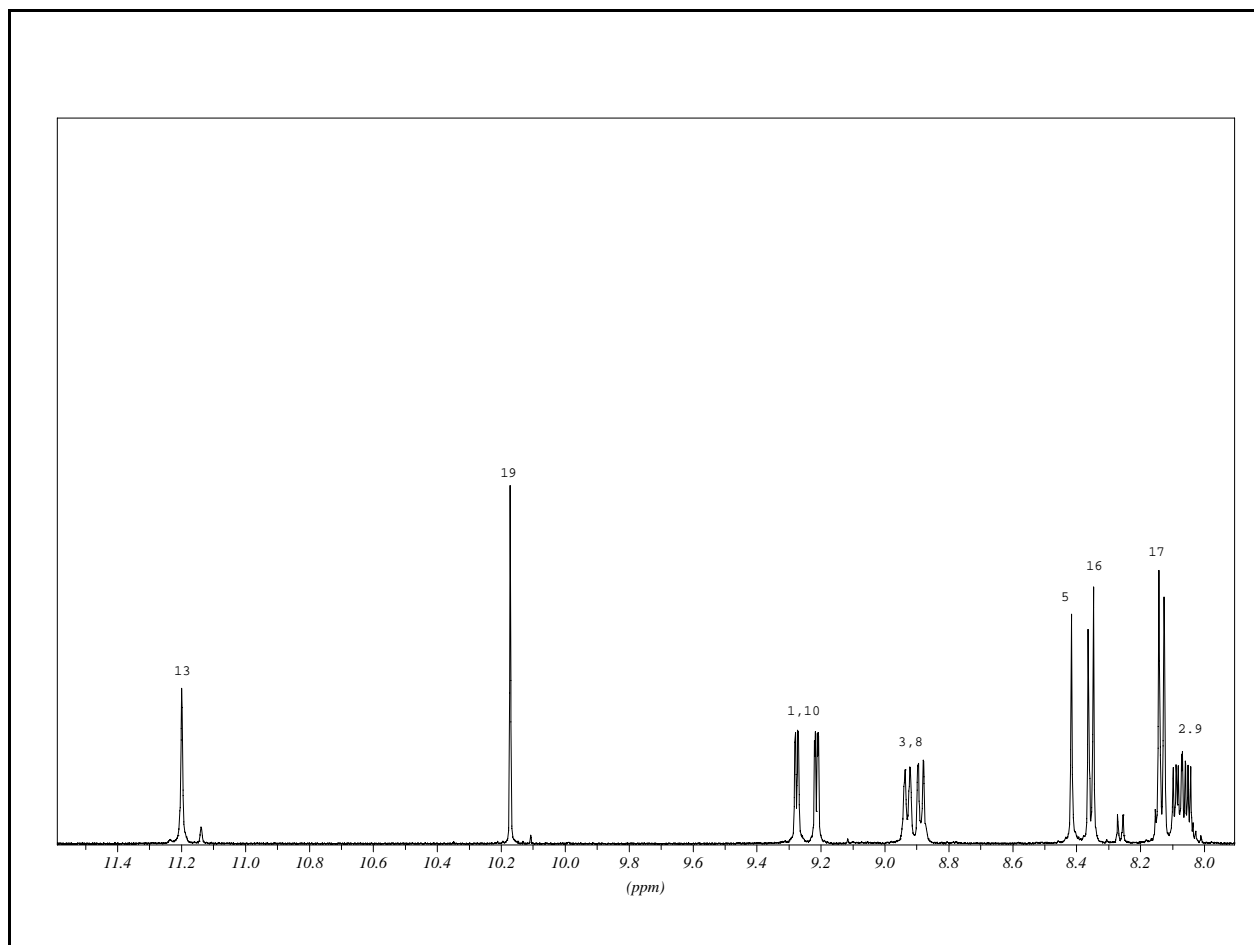
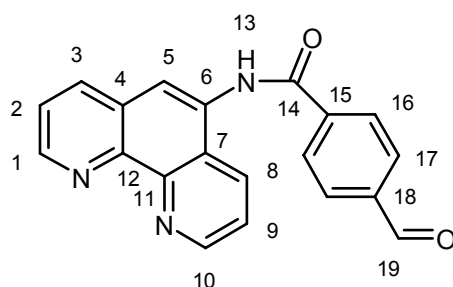


Abbildung 67:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von 64 in  $\text{DMSO-d}_6$  bei 500 MHz.

$^1\text{H}$ -NMR (500 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 8.10 (d, 2H, 15-H,  $^3J\{15\text{-H}, 16\text{-H}\} = 8.1$  Hz), 8.28 (s, 1H, 5-H), 8.73 (m, 2H, 3-H, 8-H,  $^3J\{3\text{-H}, 2\text{-H}\} = 8.5$  Hz), 9.14 (dd, 1H, 10-H,  $^3J\{10\text{-H}, 9\text{-H}\} = 3.5$  Hz,  $^4J\{10\text{-H}, 8\text{-H}\} = 1.5$  Hz), 9.19 (dd, 1H, 1-H,  $^3J\{1\text{-H}, 2\text{-H}\} = 3.5$  Hz,  $^4J\{1\text{-H}, 3\text{-H}\} = 1.5$  Hz), 10.81 (s, 1H, NH).

$^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 122.23 (C-5), 124.43 (C-9), 124.93 (C-2), 126.13 (C-4), 128.34 (C-6), 128.74 (C-10), 128.84 (C-12), 129.51 (C-17), 132.29 (C-7), 135.38 (C-11), 138.34 (C-15), 138.84 (C-18), 139.98 (C-9), 147.64 (C-10), 149.30 (C-1), 166.03 (C-14), 193.00 (C-19).

Massenspektroskopie:      hochaufgelöstes Spektrum (ESI-TOF, positiv ion mode  
In Methanol, 5 $\mu\text{M}$ )

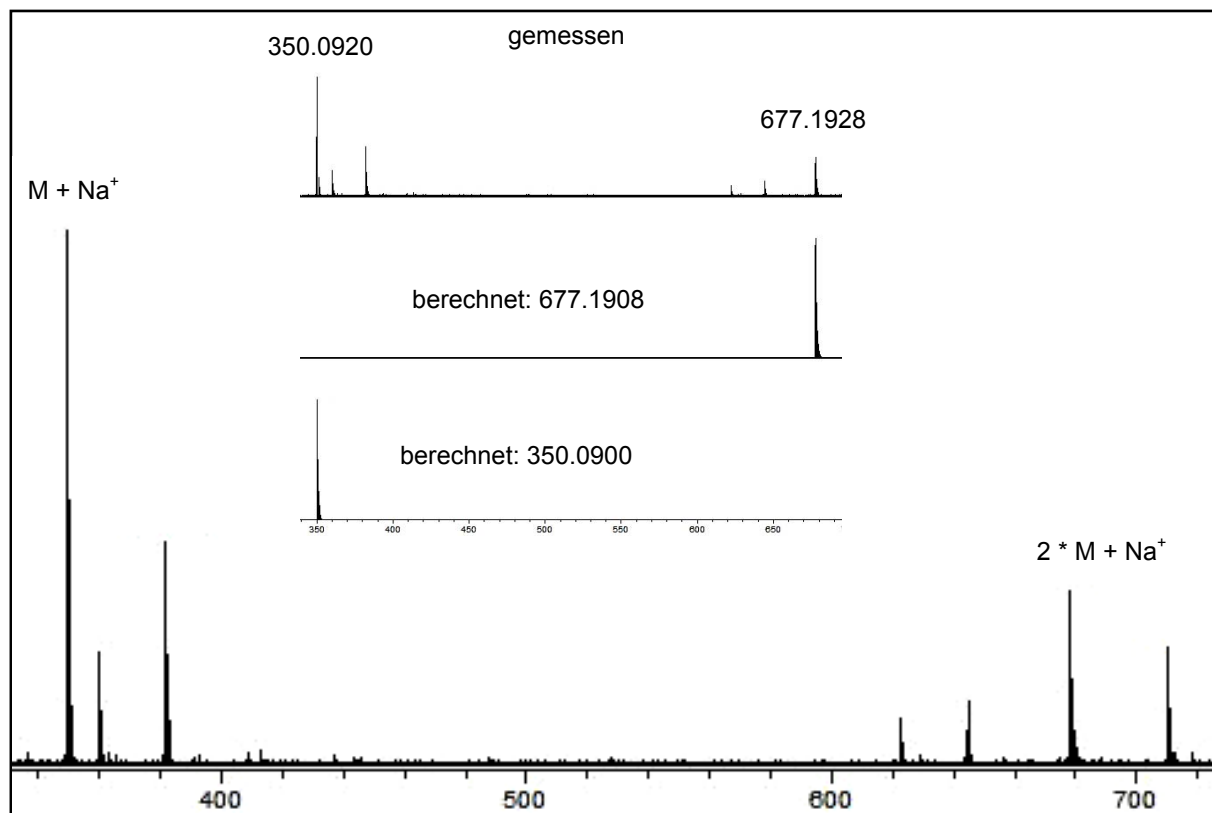


Abbildung 68 : hochaufgelöstes Massenspektrum von 65

berechnete monoisotopische Masse für $\text{C}_{40}\text{H}_{26}\text{N}_6\text{NaO}_4$ $[2\text{M} + \text{Na}^+]^+$ :	677.1908
gemessen:	677.1928
Abweichung:	2 ppm
berechnete monoisotopische Masse für $\text{C}_{20}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_2$ $[\text{M} + \text{Na}^+]^+$ :	350.0900
gemessen:	350.0920
Abweichung:	2 ppm



## 9 Literatur

- [1] W. Breuer, E. Greenberg, Z. I. Cabantchik, *FEBS Lett.* **1997**, 403, 213-219.
- [2] U. Rauen, B. Polzar, H. Stephan, H. G. Mannherz, H. de Groot, *FASEB* **1999**, 13, 155-168.
- [3] D. C. Radisky, M.C. Babcock, J. Kaplan, *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 4497-4499.
- [4] M. Babcock, D. de Silva, R. Oaks, S. D. Kaplan, S. Jiralerspong, L. Montermini, M. Pandolfo, J. Kaplan, *Science* **1997**, 276, 1709-1712.
- [5] R. Crichton, *Inorganic Biochemistry of Iron Metabolism*, John Wiley & Sons, LTD, Chichester, New York, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto, **2001**.
- [6] G. Ferreira, J. G. Moura, *Iron Metabolism*, Wiley-VCH, Weinheim, New York, Chichester, Brisbane, Singapore, Toronto, **1999**.
- [7] F. Petrat, U. Rauen, H. de Groot, *Hepatology* **1999**, 29, 1171-1179.
- [8] F. Petrat, H. de Groot, U. Rauen, *Arch. Biochem. Biophys.* **2000**, 376, 74-81.
- [9] F. Petrat, H. de Groot, U. Rauen, *Biol. Chem.* **2002**, 489-502.
- [10] W. Breuer, S. Epsztejn, Z. I. Cabantchik, *J. Biol. Chem.* **1995**, 24209-24215.
- [11] P. I. Moreira, S. L. Siedlack, G. Aliev, G. Smith, *J. Neural. Transm.* **2005**, 112, 921-932.
- [12] F. Petrat, H. de Groot, U. Rauen, *Biochem. J.* **2001**, 356, 61-69.
- [13] F. Petrat, D. Weisheit, M. Lensen, *Biochem. J.* **2002**, 362, 137-147.
- [14] Löffler, *Biochemie und Pathobiochemie, Vol. 5. Auflage*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, **1990**.
- [15] E. F. Elstner, *Der Sauerstoff*, BI-Wissenschaftsverlag, Mannheim, Wien, **1990**.
- [16] H. Boukhalfa, A. L. Crumbliss, *Biometals* **2002**, 15, 325-339.
- [17] A. Sträubli, U. A. Boelsterli, *Am. J. Physiol.* **1998**, 274, G1031-G1037.
- [18] G. Karp, *Molekulare Zellbiologie*, vierte Auflage ed., Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, **2005**.
- [19] B. Alberts, D. Bray, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, *Lehrbuch der molekularen Zellbiologie, 2 Auflage*, Wiley-VCH, Weinheim, New York, Chichester, Brisbane, Singapore, Toronto, **2001**.

- [20] *Roche-Lexikon Medizin Version 4.0, 4. Auflage*, Urban & Fischer Verlag, München.
- [21] H. Kleinig, P. Sitte, *Zellbiologie, 3 Auflage*, Gustav Fischer Verlag, **1992**.
- [22] M. S. Pyon, J. Cherry, A. J. Bjornsen, D. C. Zapien, *Langmuir* **1999**, *15*, 7040-7046.
- [23] M. E. Conrad, J. N. Umbreit, *Am. J. Hematology* **2000**, *64*, 287-298.
- [24] E. H. Morgan, *Biochim. Biophys. Acta*, **1983**, *762*, 498-502.
- [25] J. L. Pierre, M. Fontecave, R. R. Crichton, *Biometals* **2002**, *15*, 341-346.
- [26] M. Tabuchi, T. Yoshimori, K. Yamagushi, T. Yoshida, F. Kishi, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 22220-22228.
- [27] D. A. Brown, K. M. Herlihy, S. K. O`Shea, *Inorg. Chem.* **1999**, *38*, 5198-5202.
- [28] C. K. Yeung, R. P. Glahn, D. D. Miller, *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 132-136.
- [29] O. Kakhlon, Z. I. Cabantchik, *Free Rad. Biol. Med.* **2002**, *33*, 1037-1046.
- [30] D. C. Radidky, J. Kaplan, *Biochem. J.* **1998**, *336*, 201-205.
- [31] J. Weaver, S. Pollack, *Biochem. J.* **1989**, *261*, 787-792.
- [32] S. A. Gurgueira, R. Meneghini, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 13616-13620.
- [33] F. Petrat, S. Palluch, E. Dorguöz, M. Kirsch, H. G. Korth, R. Sustmann, H. de Groot, *J. Biol. Chem.* **2003**, *47*, 46403-46413.
- [34] H. J. H. Fenton, *J. Chem. Soc., Trans.* **1894**, *65*, 899-910.
- [35] A. W. Woodmansee, J. A. Imlay, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 34055-34066.
- [36] W. Dröge, *Physiol. Rev.* **2002**, *82*, 47-95.
- [37] B. Halliwell, J. M. Guttridge, *Biochem. J.* **1984**, *219*, 1-14.
- [38] O. Kakhlon, Y. Gruenebaum, Z. I. Cabantchik, *Blood* **2001**, *97*, 2863-2871.
- [39] K. D. Welch, T. Z. Davis, M. E. van Eden, S. D. Aust, *Free Rad. Biol. Med.* **2002**, *32*, 577-583.
- [40] J.M. Berg, J. L. Tomoczko, L. Stryer, *Biochemie, 5. Auflage*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, **2003**.
- [41] M. A. Hough, S. S. Hasnain, *J. Mol. Biol.* **1999**, *287*, 579-592.
- [42] M. L. Kremer, *J. Phys. Chem. A.* **2003**, *107*, 1734-1741.
- [43] J. Weinstein, B. H. J. Bielski, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *3*, 58-62.
- [44] B. Halliwell, J. M. Guttridge, *Methods Enzymol.* **1990**, *186*, 1-85.

- [45] D. W. Wallance, *Ment. Retard. Dev. Disabil.* **2001**, 7, 158-166.
- [46] G. R. Buettner, *Arch. Biochem. Biophys.* **1993**, 300, 535-543.
- [47] K. Tanaka, T. Hashimoto, *J. Nutr.* **1997**, 127, 2060-2064.
- [48] F. Q. Schafer, G. R. Buettner, *Free Rad. Biol. Med.* **2000**, 28, 1175-1181.
- [49] F. Gueraud, G. Peiro, J. M. Wal, G. Bories, *Free Rad. Biol. Med.* **2006**, 40, 54-62.
- [50] R. Meneghini, *Free Rad. Biol. Med.* **1997**, 23, 783-792.
- [51] A. Barbouti, P. T. Doulias, B. Z. Zhu, B. Frei, D. Glaris, *Free Rad. Bio. Med.* **2001**, 31, 490-498.
- [52] M. L. Michaels, C. Cruz, A. P. Grollmann, J. H. Miller, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1992**, 89, 7022-7025.
- [53] K. S. Kaprzak, *Free Rad. Bio. Med.* **2002**, 32, 958-967.
- [54] C. J. Burrows, J. G. Muller, *Chem. Rev.* **1998**, 98, 1109-1151.
- [55] C. E. Grey, P. Adlercreutz, *J. Agric. Food Chem.* **2006**, ASAP.
- [56] T. Lindahl, *Nature* **1993**, 362, 709.
- [57] A. Grosslaur, L. Rensing, *Zeitschrift für Geontologie und Geriatrie* **2002**, 35, 139-150.
- [58] T. Lindahl, R. D. Wood, *Science* **1999**, 286, 1897-1905.
- [59] L. J. Marnett, *Carcinogenesis* **2000**, 21, 361-370.
- [60] O. D. Schäfer, *Angew. Chem.* **2003**, 115, 3052-3082.
- [61] M. M. Greenberg, *Chemical Research in Toxicology* **1998**, 11, 1235-1248.
- [62] C. Crean, N. E. Geacintov, V. Shafirovich, *Angew. Chem.* **2005**, 117, 5185-5188.
- [63] A. J. Kowaltowski, A. E. Vercesi, *Free Rad. Biol. Med.* **1999**, 26, 463-471.
- [64] J. Ude, M. Koch, *Die Zelle, 3 Auflage*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, **2002**.
- [65] Lodish, Baltimore, Berk, Zipursky, Matsudaira, Darnell, *Molekulare Zellbiologie*, Walter de Gruyter, Berlin, New York, **1996**.
- [66] A. H. V. Schapira, *Biochim. Biophys. Acta*, **1999**, 1410, 99-102.
- [67] A. H. V. Schapira, *Biochim. Biophys. Acta*, **1999**, 1410, 159-170.
- [68] D. R. Richardson, C. Mouralian, P. Ponka, E. Becker, *Biochim. Biophys. Acta*, **2001**, 1536.

- [69] E. Perret, A. Lakkaraju, S. Deborde, R. Schreiner, E. Rodriguez-Boulan, *Cell Biology* **2005**, 17, 423-434.
- [70] K. Öllinger, K. Roberg, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 23707-23711.
- [71] T. Kurz, A. Leake, T. Zglinicke, U. Brunk, *Biochem. J.* **2004**, 378, 1039-1045.
- [72] M. Tenopoulou, P. T. Doulias, A. Barbouti, U. Brunk, D. Galaris, *Biochem. J.* **2005**, 387, 703-710.
- [73] Z. Yu, H. L. Persson, J. W. Eaton, U. Brunk, *Free Rad. Bio. Med.* **2003**, 34, 1243-1252.
- [74] H. L. Persson, Z. Yu, O. Tirosh, J. W. Eaton, U. T. Brunk, *Free Rad. Bio. Med.* **2003**, 34, 1295-1305.
- [75] P. T- Doulias, S. Christoforidis, U. T. Brunk, D. Galaris, *Free Rad. Bio. Med.* **2003**, 35, 719-728.
- [76] W. Schmidt, *Optische Spektroskopie, Eine Einführung, 2. Auflage*, Wiley-VCH, Weinheim, **2000**.
- [77] J. D. Grower, G. Healing, C. J. Green, *Anal. Biochem.* **1989**, 180, 126-130.
- [78] R. Balinga, N. Ueda, S. V. Shah, *Biochem. J.* **1993**, 291, 901-905.
- [79] D.Y.Yegerov, A. V. Kozlov, O. A. Azizova, Y. A. Vladimirov, *Free Rad. Biol. Med.* **1993**, 15, 565-574.
- [80] P. Nielsen, J. Düllmann, U. Wulfhekel, H. C. Heinrich, *Int. J. Biochem.* **1993**, 25, 223-232.
- [81] U. Rauen, F. Petrat, T. Li, H. de Groot, *FASEB* **2000**, 14, 1953-1964.
- [82] B. P. Esposito, S. Epsztejn, W. Breuer, Z. I. Cabantchik, *Anal. Biochem.* **2002**, 304, 1-18.
- [83] F. Petrat, H. de Groot, U. Rauen, *Biol. Chem.* **2002**, 489-502.
- [84] R. D. Alexander, D. H. Buisson, A. W. L. Dudeney, R. J. Irving, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **1977**, 170, 1081-1088.
- [85] D. Weisheit, *Dissertation* **2003**, 47.
- [86] M. J. S. Dewar, T. Mole, *J. Chem. Soc.* **1956**, 2556-2557.
- [87] G. F. Smith, F. W. Cagle, *J. Org. Chem.* **1947**, 30, 781-784.
- [88] J. P. Lecomte, A. Kirsch-de Mesmaeker, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **1993**, 89, 3261-3269.

- [89] D. Solas, L. Hale, D. V. Patel, *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 1537-1539.
- [90] E. F. Elslager, *J. Org. Chem.* **1962**, 27, 4346-4349.
- [91] A. Gossauer, F. Nydegger, T. Kiss, R. Sleziak, H. Stoeckli-Evans, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 1172-1780.
- [92] H. Kouttaka, J. Kosuge, N. Fukasaku, T. Nagano, *Chem. Pharm. Bull.* **2004**, 52, 700-703.
- [93] C.-W. Wan, A. Burghardt, J. Choin, K. Burgess, *Chem. Eur. J.* **2003**, 9, 4430-4441.
- [94] F. Bergström, I. Mikhalyov, P. Häggglöf, R. Wortmann, T. Ny, L. B. Johansson, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 196-204.
- [95] T. Kalai, E. Hideg, J. Jeko, K. Hideg, *Tetrahedron Lett.* **2003**, 44, 8497-8499.
- [96] Y. Gabe, Y. Urano, H. Kojima, H. Nagano, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 126, 3357-3367.
- [97] T. A. Golovka, D. V. Kozlov, D. C. Neckers, *J. Org. Chem.* **2005**, 70, 5545-5549.
- [98] A. Burghardt, H. Kim, M. B. Welch, L. H. Thoresen, J. Reibenspies, K. Burgess, *J. Org. Chem.* **1999**, 64, 7813-7819.
- [99] F. Amat-Guerri, M. Liras, M. L. Carrascosco, R. Sastre, *Photochemistry and Photobiologie* **2003**, 77, 577-584.
- [100] M. Baruah, W. Qin, N. Basaric, W. M. de Borggraeve, N. Boens, *J. Org. Chem.* **2005**, 70, 4152-4157.
- [101] M. Baruah, W. Qin, R. A. L. Vallee, D. Beljonne, T. Rohand, W. Dehaen, N. Boens, *Organic Letters* **2005**, 7, 4377-4380.
- [102] T. Yogo, Y. Urano, Y. Ishitsuka, F. Maniwa, T. Nagano, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 12162-12163.
- [103] Z. Li, E. Mintzner, R. Bittmann, *J. Org. Chem.* **2006**, 71, 1718-1721.
- [104] C. Nicolini, J. Baranski, R. Winter, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 192-201.
- [105] J. Li, I. H. Kim, A. Lynch, C. Z. Ding, Z. Ma, *Bioorg. & Med. Chem. Lett.* **2006**, 16, 794-797.
- [106] G. Ulrich, R. Ziesel, *Tetrahedron Letters* **2004**, 45, 1949-1953.
- [107] Y. Wu, X. Peng, B. Guo, J. Fan, Z. Zhang, J. Wang, A. Cui, Y. Gao, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, 3, 1387-1392.

- [108] T. Rohand, M. Baruah, N. B. W. Qin, W. Dehaen, *Chem. Commun.* **2006**, 266-268.
- [109] C. N. Baki, E. U. Akkaya, *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 1512-1513.
- [110] B. Turfan, E. U. Akkaya, *Org. Letters* **2002**, 4, 2857-2859.
- [111] M. Koepf, A. Trablsi, M. Elhabiri, J. A. Wytko, D. Paul, A. M. Albracht-Gary, J. Weiss, *Org. Lett.* **2005**, 7, 1279-1282.
- [112] M. Sprecher, R. Breslow, O. Uziel, T. M. Link, *Org. Prep. Proced. Int.* **1994**, 24, 696-701.
- [113] V. Fargeas, *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 1711-1721.
- [114] C. A. Panetta, H. J. Kumpaty, N. E. Heimer, C. Leavy, C. L. Hussey, *J. Org. Chem.* **1998**, 64, 1015-1021.
- [115] A. Scott A, P., *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 10048-10051.
- [116] B. Imperiali, T. J. Prins, S. L. Fisher, *J. Org. Chem.* **1993**, 58, 1613-1616.
- [117] A. Alberola, A. Gonzalez, M. L. Sadaba, C. Sandu, *Tetrahedron* **1999**, 55, 6555-6566.
- [118] F. Petrat, H. de Groot, U. Rauen, *Biochem. J.* **2001**, 356, 61-69.
- [119] F. Petrat, *Dissertation* **2000**.
- [120] B. H. Novak, T. D. Lash, *J. Org. Chem.* **1998**, 3998-4010.
- [121] G. Smith, F., C. F. W., *J. Org. Chem.* **1947**, 30, 781-784.
- [122] A. Springer, *Diplomarbeit* **2002**, 46-47.
- [123] M. Sprecher, R. Breslow, O. Uziel, T. M. Link, *Org. Prep. Proced. Int.* **1994**, 24, 696-701.
- [124] A. Scott , P. Adam, *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 10048-10051.
- [125] W. Herz, K. Dittmer, S. J. Cristol, *J. Am. Chem. Soc.* **1947**, 69, 1698-1700.

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name: Andrea Springer  
Geburtsdatum: 09.03.1974  
Geburtsort: Wesel  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: verheiratet  
Anschrift: Isselstrasse 26, 46499 Hamminkeln

## Ausbildung

09/1984 - 07/1990 Werner-von-Siemens-Realschule  
08/1990 - 01/1994 Ausbildung zur Chemielaborantin am Max-Planck-Institut für Strahlenchemie in Mülheim an der Ruhr  
09/1994 - 07/1996 Erwerb der Fachhochschulreife an der Fachschule für Technik in Dinslaken  
01/1994 - 01/1995 Angestellte am Max-Planck-Institut für Strahlenchemie in Mülheim an der Ruhr  
10/1996 - 11/2001 Studium Chemie DII an der Gesamthochschule-Universität Essen  
10/1998 Diplom-Vorprüfung  
11/2001 Diplom-Hauptprüfung  
12/2001 - 09/2002 Diplomarbeit im Fach Organische Chemie unter Anleitung von Prof. Dr. R. Sustmann  
Thema: Entwicklung einer Fluoreszenzsonde zur Bestimmung von chelatisierbaren Eisen im Zellkern  
10/2002 - 07/2006 Beginn der Promotion zum Dr. rer. nat.  
Thema: Fluoreszenzsonden zur Quantifizierung des chelatisierbaren Eisenpools in Kompartimenten vitaler Zellen, Institut für Organische Chemie (Prof. Dr. R. Sustmann)  
Institut für Physiologische Chemie (Prof. Dr. H. de Groot) der Universität Duisburg-Essen bzw. des Universitätsklinikums Essen

